

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

« ____ » _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва Лактобактерину. Дільниця
підготовки посівного матеріалу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Державцева Юлія Ігорівна _____

Керівник:

асистент

Олійник Наталія Миколаївна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

старший викладач, к.т.н.,

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

доцент, к.т.н.

Козар Марина Юріївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6206. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	131	
3	A1	ДП 6206. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6206. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6206. 03.000 ТК	Посівний апарат	1	

				ДП 6206 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.					1	1
Керівн.					КП ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консульт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт студенту
Державцевій Юлії Ігорівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва Лактобактерину. Дільниця підготовки посівного матеріалу», керівник проєкту Олійник Наталія Миколаївна, ас., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с
2. Термін подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Lactobacillus plantarum* 8P-A3; середовище для отримання посівного матеріалу – МРС-1; посівний апарат для вирощування посівного матеріалу – об'єм 0,1 м³; параметри культивування: $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, анаеробні умови, $\tau = 24$ год; кінцевий продукт – ліофільно висушена біомаса штаму-продуценту у флаконах для забезпечення лікувально-профілактичних потреб людини.
4. Зміст пояснювальної записки: обрати та навести характеристику продуцента для виробництва пробіотичного препарату Лактобактерину; визначити біохімічні основи виробництва кінцевого продукту;

проаналізувати методи створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції посівного апарату, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов’язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду посівного апарату – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	26.02.20-15.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	16.03.20-30.03.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	31.03.20-15.04.20	
4.	Технологічна частина	16.04.20-30.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	04.05.20-20.05.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	21.05.20-30.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки та подання готової роботи на рецензію	01.06.20-08.06.20	

Студент

Юлія Державцева

Керівник

Наталія Олійник

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва Лактобактерину.
Дільниця підготовки посівного матеріалу»

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить: 15 рис., 4 табл., 73 посилання.

Робота присвячена дослідженню реалізації біологічного і технологічного потенціалу відомих виробничих штамів при промисловому конструюванні пробіотичного препарату Лактобактерину.

Запропоновано в якості продуцента пробіотику використовувати штам факультативно-гетероферментативних молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, отриманий у результаті селекції шляхом індукованого мутагенезу з використанням низькочастотного електромагнітного випромінювання як мутагенного фактору впродовж трьох годин.

Розраховано та обрано обладнання для вирощування посівного матеріалу, що забезпечує максимальний рівень автоматизації процесу та захисту посівної культури *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 від можливої контамінації. Наведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки посівного апарату, які засвідчують перспективність використання обраної конструкції. В роботі обгрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

Розроблена технологія відповідає санітарно-гігієнічним нормам та вимогам належної виробничої практики.

Готовий продукт рекомендовано до використання з лікувальною та профілактичною метою дорослим і дітям при порушеннях біоценозу кишечника різної етіології.

МОНОШТАМОВИЙ ПРОБІОТИК, ЛАКТОБАКТЕРІЇ, МІКРОФЛОРА,
ЛЮФІЛІЗОВАНА МІКРОБНА МАСА, ДИСБАКТЕРІОЗ,
МІКРОБІОЛОГІЧНО ЧИСТА ПРОДУКЦІЯ.

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Державцева Ю.І.				РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	5	131
Керівник	Олійник Н.М.					КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Затвер.								

ABSTRACT

The diploma project contains: 15 figures, 4 tables, 73 references.

The work is devoted to the study of the implementation of the biological and technological potential of known production strains in the industrial design of the probiotic drug *Lactobacillus*.

It is proposed to use a strain of facultative-heterofermentative lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* 8P-AZ as a probiotic producer, obtained as a result of selection by induced mutagenesis using low-frequency electromagnetic radiation as a mutagenic factor for three hours.

Equipment for growing seed material has been calculated and selected, which provides the maximum level of automation of the process and protection of the crop *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 from possible contamination. The technological, structural and thermal calculations of the bioreactor are presented, which certify the prospects of using the chosen construction. The technological and hardware schemes of production are substantiated and presented in the work.

The developed technology meets the sanitary and hygienic standards and requirements of good manufacturing practice.

The finished product is recommended for use for therapeutic and preventive purposes for adults and children with disorders of intestinal biocenosis of various etiologies.

MONOSTABLE PROBIOTIC, LACTOBACILLI, MICROFLORA,
FREEZE-DRIED MICROBIAL MASS, DYSBACTERIOSIS,
MICROBIOLOGICALLY PURE PRODUCTION.

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив	Державцева Ю.І.					Д	6	131
Консульт.								
Керівник	Олійник Н.М.							
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського		

ЗМІСТ

ВСТУП.....	
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	
1.1. Основні промислові продуценти	
1.2. Систематичне положення мікроорганізму-продуценту	
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки	
1.4. Культуральні ознаки	
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки	
1.6. Серологічні ознаки та фактори патогенності	
1.7. Поширення в природі	
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	
2.1. Характеристика кінцевого продукту	
2.2. Схема хімічних перетворень, що відбуваються в процесі біосинтезу	
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	
2.4. Методи очистки цільового продукту	
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси	
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	
3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи	
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	
3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів.....	
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу	
3.2.3. Використання гібридизації для створення продуцентів Лактобактерину..	

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Державцева Ю.І.				Д	7	131
Консульт.								
Керівник		Олійник Н.М.						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського		

3.2.4. Регуляція метаболізму у мікробній клітині	
3.2.5. Використання особливих методів, що застосовуються для отримання продуцентів для даної технології і не застосовуються в інших	
3.2.6. Використання методів генної та клітинної інженерії.....	
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі	
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	
4.3. Опис технологічного процесу.....	
4.4. Матеріальний баланс.....	
4.5. Контроль виробництва	
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	
5.1.Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	
5.2.Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання	
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	
ВИСНОВКИ	
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	

ВСТУП

Внаслідок незбалансованого харчування, дефіциту вітамінів, мікроелементів, прийому антибактеріальних препаратів, а також під дією зростаючого забруднення навколишнього середовища потенційно небезпечними для живих організмів хімічними сполуками відбувається руйнування еволюційно сформованих природних мікробіоценозів людини. Оскільки частота поширення дисбактеріозу різного ступеня прояву серед населення світу за деякими оцінками сягає 90%, очевидно, що важливими є дослідження, спрямовані на створення препаратів, які відновлюють мікроекологічний баланс в організмі людини.

Важлива роль в лікуванні і профілактиці дисбактеріозів відводиться пробіотикам, до складу яких входять представники нормальної мікрофлори людини, в тому числі лактобактерії. Останні широко розповсюджені на слизових оболонках порожнин організму і значною мірою визначають функціональну активність мікробіоценозів даних біотопів. Лактобактерії є постійним об'єктом досліджень в мікробній екології людини. Практичне використання їх позитивних властивостей ілюструється багаторічним досвідом виготовлення і застосування вітчизняних біопрепаратів (Лактобактерин, Ацилакт, Пробіланс тощо). Препарати з лактобактеріями діють на організм людини, не даючи побічних ефектів, і не мають протипоказань для використання. Відома стійкість лактобактерій до антибіотиків дозволяє застосовувати лактовмісні препарати на тлі антибіотикотерапії.

Розширення сфер застосування пробіотиків (акушерство і гінекологія, стоматологія, дерматологія та інші) визначає необхідність розробки препаратів з підвищеною біологічною активністю, нових лікарських форм і

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Державцева Ю.І.				ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	9	131
						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Керівник	Олійник Н.М.							
Затвер.								

оптимізації технологічного процесу. Метою даної роботи є дослідження реалізації біологічного і технологічного потенціалу відомих виробничих штамів лактобактерій при конструюванні пробіотичного препарату Лактобактерину.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Для отримання цільового продукту – пробіотичного препарату Лактобактерину в якості продуцентів використовують мікроорганізми роду *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum* або *Lactobacillus fermentum*). Даний рід включає безспорові, грам-позитивні паличковидні бактерії, зазвичай правильної форми, що є представниками нормальної мікрофлори людини. Для виробництва Лактобактерину використовують один із таких штамів лактобактерій: *Lactobacillus plantarum* 8P-A3; *Lactobacillus plantarum* 38; *Lactobacillus fermentum* 90T-C4; *Lactobacillus fermentum* 39 [1].

Для характеристики наведених штамів проаналізуємо адгезивну активність, стійкість до антибактеріальної дії біологічних рідин (шлунковий сік, жовч), антагоністичну активність і антибіотикочутливість.

Дослідження вченими адгезії на моделі людських еритроцитів за методикою В.І. Бріліс показали низький ступінь активності виробничих штамів лактобактерій. При порівняльній оцінці науковцями не виявлено достовірної різниці між адгезивними властивостями штамів *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 і *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 [2].

Літературний огляд стійкості штамів до біологічних рідин дозволяє зробити висновок про високу резистентність *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 до шлункового соку і жовчі. Серед виду *Lactobacillus fermentum* відзначена більш висока стійкість до впливу біологічних рідин у штаму *Lactobacillus fermentum* 90T-C4.

Антагоністична активність виробничих штамів лактобактерій визначається *in vitro* методом відстроченого антагонізму на щільному поживному середовищі МРС-5 щодо стандартного набору тест-штамів, які

					ПБ.БТ6206.ДП		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Державцева Ю.І.					
Консульт.							
Керівник		Олійник Н.М.					
Затвер.							

використовуються при контролі пробіотиків. Дослідниками Національного фармацевтичного університету встановлено, що найбільшою інгібуючою активністю володіють штами *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 і *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 [3].

Пробіотики, до складу яких входять штами, резистентні щодо широкого кола антибіотиків, краще підходять для бактеріальної терапії. Так, штами *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 і *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 володіють значною стійкістю до багатьох антибіотиків, чутливість проявляють тільки щодо левоміцетину і рифампіцину, а відносно олеандоміцину – проміжну чутливість [4].

При виборі оптимального штаму продуцента необхідно врахувати також такі технологічні характеристики виробничих штамів як рівень накопичення біомаси при глибинному культивуванні, стійкість до ліофільного висушування і стабільність в процесі зберігання. За рівнем накопичення біомаси при глибинному культивуванні з використанням казеїново-дріжджового середовища в численних дослідженнях виявлено перевагу штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 порівняно з іншими досліджуваними штамми. Результати визначення кількості життєздатних клітин в висушеній біомасі свідчать, що за чутливістю до впливу несприятливих наслідків ліофілізації досліджувані штами цілком подібні, втрата життєздатних клітин становить близько 50%. В процесі зберігання сухих культур штамів при температурі $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$ кількість живих клітин зменшується не більше ніж на 24% [5].

Аналіз сукупності біологічних і технологічних властивостей вищезгаданих штамів лактобактерій дозволяє стверджувати про перспективність вибору штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 для виробництва пробіотику Лактобактерину.

Lactobacillus plantarum 8P-A3 – другий за чисельністю штам лактобацил у складі нормальної мікрофлори здорової людини (19 %) [6]. У процесі метаболічної активності вказаного штаму утворюється молочна

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

кислота, лізоцим, перекис водню, бактеріоцини (лактацини), коротколанцюгові жирні кислоти, діацетил. *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 має високу антагоністичну активність по відношенню до широкого спектру аеробних та факультативно-анаеробних грампозитивних і грамнегативних бактерій, а також деяких облігатно-анаеробних бактерій (сальмонели, шигели, клостридії, стафілококи, стрептококи, лістерії, гриби) [7].

1.2. Систематичне положення мікроорганізму-продуценту

Для виробництва Лактобактерину в якості продуцента було обрано штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. За сучасною класифікацією даний мікроорганізм займає таке систематичне положення:

- царство *Bacteria*;
- тип *Firmicutes*;
- клас *Bacilli*;
- порядок *Lactobacillales*;
- родина *Lactobacillaceae*;
- рід *Lactobacillus*;
- вид *Lactobacillus plantarum*.

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

Штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 являє собою палички правильної форми із заокругленими кінцями, розміщені поодинокі або короткими ланцюжками. Розміри клітин варіюють в інтервалі 0,7 – 1,1 x 3,0 – 8,0 мкм і залежать від умов росту: складу поживного середовища, температурного режиму, аерації, а також віку культури. Дані мікроорганізми - нерухомі, не утворюють ендоспор і капсул, не мають джгутиків, грампозитивні. Клітинна стінка представлена гомогенним електронно-щільним шаром товщиною 15 – 60 мкм. Цитоплазматична мембрана товщиною 75-85 А. В цитоплазмі клітин

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

виявлені рибосоми діаметром близько 150 А, область ядерного матеріалу (нуклеоїд), який складається з тонких щільних ниток шириною 20-25 А, що ототожнюються з дезоксирибонуклеїною кислотою.

1.4. Культуральні ознаки

Одними з найбільш досліджуваних та важливих є культуральні ознаки – ряд властивостей росту мікроорганізмів на поживних середовищах. Саме за характером росту колонії, її видоспецифічністю та різноманіттям визначається приналежність досліджуваної культури мікроорганізмів до певного виду.

Культуральною особливістю та властивістю штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 є рівний чіткий характер контуру краю, випуклий профіль та гладка поверхня. При цьому колонії штаму бактерій характеризуються однорідною структурою та щільною консистенцією (рисунок 1.1.). Колонії як правило не пігментовані, білого або дещо кремового кольору.

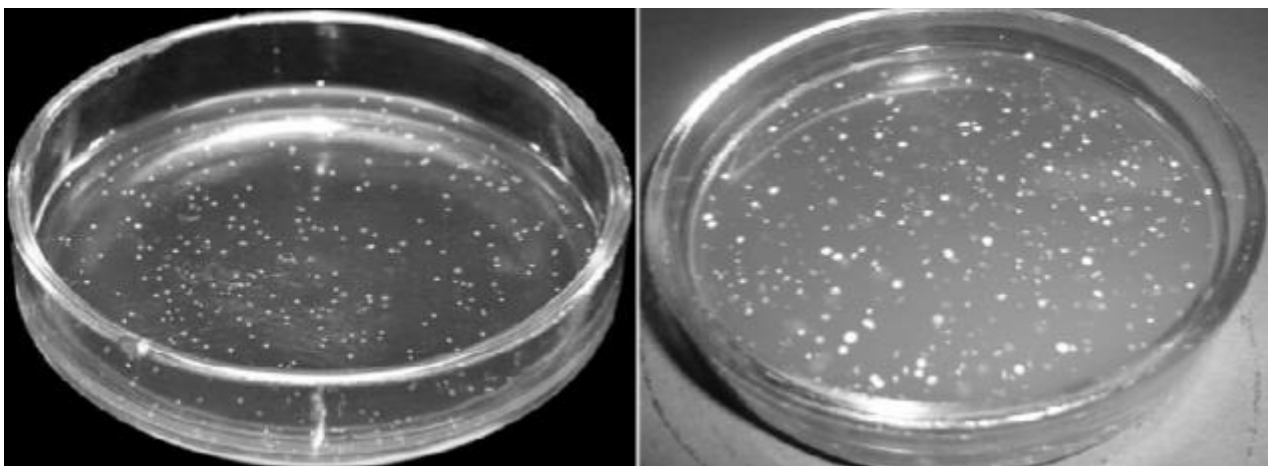


Рисунок 1.1. Колонії *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 на щільному поживному середовищі МРС-4

Рівні колонії білого кольору, що мають діаметр від 2 до 5 мм, утворюються на щільних середовищах на другу добу культивування (на мінерально-рослинному або капустяному агарі). Штам *Lactobacillus*

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

plantarum 8P-A3 на таких середовищах, як МРС-4, Lactobacillus MRS agar та Лактобакагар формує гладкі округлі колонії зі сфероподібною поверхнею характерного білого кольору, діаметр яких варіюється в межах від 1,8 до 2,5 мм. При культивуванні штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 на поверхні агару з гідролізованим молоком (АГМ) утворюються сірі опуклі круглі колонії, що мають діаметр від 0,5 до 2 мм, котрий насамперед залежить від густоти та характеру посіву. Даний штам здатний згортати знежирене стерильне молоко без утворення сироватки, але з наявністю рівних сметаноподібних згустків.

При глибинному посіві на щільні поживні середовища можливе також утворення колоній у вигляді правильних лінз (сочевицеподібних), колоній трикутної і неправильної форми або таких, що нагадують сніжинку чи грудочку вати. Якщо в середовище було додано крейду, то навколо колоній внаслідок накопичення молочної кислоти утворюється зона розчинення крейди.

Хороший ріст спостерігається у напіврідкому поживному середовищі, що містить 0,15-0,75% агару. Невеликі концентрації агару забезпечують низький окиснювально-відновний потенціал середовища і створюють сприятливі мікроаерофільні умови. За характером росту у напіврідкому середовищі виділяють п'ять можливих варіантів: (1) ріст у вигляді кульок, (2) у вигляді поздовжньої смугастості, (3) придонний, (4) поверхневий, (5) рівномірне помутніння середовища.

При культивуванні на рідких поживних середовищах *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 найчастіше утворює рівномірне помутніння, після припинення росту осідаючи у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівчастого осаду. Плівки на поверхні середовища ніколи не утворюються. На рідкому середовищі МРС-1 даний мікроорганізм виростає у вигляді рівномірної муті і гомогенного білого осаду на дні пробірки [8].

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

Поживні потреби мікроорганізму: найбільш важливим джерелом енергії є моно- та дисахариди, органічні кислоти в концентрації 30 – 50 мкг/мл. Штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 ферментує глюкозу з утворенням молочної кислоти без вуглекислого газу; розкладає целобіозу, галактозу, сахарозу; слабо ферментує сорбіт, мальтозу, лактозу, маніт; рамнозу не ферментує. Із жирних кислот ріст стимулюють олеїнова, лінолева та ліноленова кислоти. Серед факторів росту необхідними є ряд амінокислот: аргінін, цистеїн, глутамінова кислота, лейцин, фенілаланін, триптофан, тирозин, валін; вітаміни: пантотенова, нікотинова кислоти, біотин, тіамін. Потреби в макро- та мікроелементах задовольняють сполуки міді, заліза, натрію, калію, фосфору, йоду, сірки, магнію та марганцю [9].

Lactobacillus plantarum 8P-A3 притаманний гетеротрофний тип живлення (мікроорганізм є хемоорганотрофом і потребує багатих складних поживних середовищ). Для забезпечення росту та збереження культури використовуються наступні елективні середовища: середовище Блікфельда, середовище Рогоза, середовище МРС. Ріст на цих поживних середовищах характеризується високим титром культури (протягом 1 доби культивування титр становить $3,0 \times 10^9$ КУО/мл) [10].

В промислових масштабах використовують поживні середовища збалансовані по азотному, вуглеводному і вітамінному складі, які містять всі необхідні поживні і стимулюючі речовини, що знаходяться в формі, яка легко засвоюється мікроорганізмом. Так, одержання посівного матеріалу здійснюють на рідкому середовищі МРС-1 наступного складу (г/дм³): $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; цистеїн — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; амоній лимоннокислий — 2,0; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 5,0; пептон сухий ферментативний — 10,0; глюкоза — 20,0; рідкі компоненти, см³/дм³: печінковий екстракт — 100,0; дріжджовий автолізат (вміст амінного азоту

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

0,15 %) — 50,0; гідролізат знежиреного молока — 330,0; твін-80 — 1,0; вода очищена — до 1,0 дм³; рН готового середовища — 6,4±0,2.

Виробничий біосинтез проводять на казеїно-дріжджовому середовищі (КД) наступного складу (г/дм³): дріжджовий автолізат — 25,0; панкреатичний гідролізат казеїну — 21,0; вода очищена — до 1,0 дм³; рН готового середовища — 6,4±0,2.

По відношенню до кисню *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 належить до факультативних анаеробів, що ростуть в атмосфері вуглекислого газу, азоту, а також в присутності кисню. Температурний діапазон існування даного організму — 20 - 45°C (вище 45°C ріст не спостерігається). Оптимальна температура для росту 37°C. Показник кислотності середовища для штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 знаходиться у межах 5,5 – 7,0. Оптимальне значення рН становить 6,8 [1,8].

Енергетичний метаболізм бродильного типу, цукропластичний; більше половини вуглецю кінцевих продуктів бродіння випадає на лактат (близько 70%), що свідчить про те, що даний штам належить до факультативно-гетероферментативних лактобактерій. Гетероферментативні мікроорганізми володіють двома шляхами метаболізму цукрів, при цьому зброджування гексоз відбувається по гліколітичному шляху, а пентоз - по окиснювальному пентозофосфатному. За достатньої кількості гексоз їх зброджування проходить по гліколітичному шляху, а при зниженні кількості гексоз, наявність в поживному середовищі пентоз індукує синтез ферменту фосфокетолази. Даний фермент відіграє важливу роль в енергетичному метаболізмі бактерій і дає можливість отримати високоенергетичний ацетилфосфат з фосфорильованих цукрів (ксилоулозо-5-фосфату, фруктозо-6-фосфату). Специфічними для штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 є ферменти глікозилгідролази. Наявність цих ферментів визначає здатність штаму до утилізації фосфоолігосахариду рафінози, що часто використовується в складі пробіотичних препаратів у якості пребіотичного

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

компоненту. Також даний штам здатний утворювати позаклітинні нуклеази при вирощуванні на агарі, що містить ДНК або РНК [11].

Хімічний склад бактеріальної клітини: білки – 55%, РНК - 20,5%, ДНК - 3,1 %, ліпіди - 9,1 %, ліпополісахариди - 3,4 %, пептидоглікан - 2,5 %. Для *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 характерний пептидоглікан групи А, в складі якого діамінокислота включає лізин, мезо- діамінопімелінову кислоту, орнітин [8]. Розмножується даний організм шляхом поділу клітини, іноді перешнуровуванням [12].

Lactobacillus plantarum 8P-A3 позбавлений таких гемопротеїнів, як цитохроми і каталаза. Незважаючи на це, для даного мікроорганізму характерні досить різноманітні механізми захисту від токсичної дії активних форм кисню (АФК): (1) фермент супероксиддисмутаза, що каталізує реакцію дисмутації супероксидних радикалів з утворенням перекису водню і кисню; (2) високі внутрішньоклітинні концентрації іонів Mn^{2+} (до 30 мМ), що здатні ефективно усувати супероксидні іони; (3) механізм прискорення гліколітичного розкладання глюкози в аеробних умовах (в аеробних умовах водень з НАД-Н₂ прямо передається на О₂, звільняючи частину пірувату від його акцепторної функції в молочнокислому бродінні. Піруват окиснюється до ацетил-КоА, подальше метаболізування якого до ацетату призводить до синтезу молекули АТФ.

Lactobacillus plantarum 8P-A3 чутливий до антибіотиків левоміцетину і рифампіцину, а відносно олеандоміцину має проміжну чутливість. Організм володіє хромосомною стійкістю до наступного ряду антибіотиків: поліміксину, гентаміцину, неоміцину, мономіцину, тетрацикліну, налідіксової кислоти, котрімоксазолу, канаміцину, сульфаніламідних препаратів тощо. Плазмідної ДНК, що відповідає за розповсюдження антибіотикорезистентності серед інших бактерій, *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 не містить, що забезпечує широке лікувально-профілактичне використання штаму [13].

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

Найбільш чутливими до бактеріофагів є мезофільні лактококи. Штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 менш схильний до фаголізу порівняно з лактококами, але є нестійким відносно фагів групи А відповідно до класифікації Бредлі і Аккермана (фагів, що мають скорочувальний хвостовий відросток). Даному штаму притаманні 3 плазмиди з малими молекулярними масами (менше 10 МД). Вважається, що такі плазмиди не здатні до самостійного переносу, до того ж у лактобактерій відсутні статеві ворсинки [14].

1.6. Серологічні ознаки та фактори патогенності

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ), Управління з контролю за харчовими продуктами і лікарськими препаратами США (Food and Drug Administration - FDA) і Організація з продуктів харчування і сільського господарства Організації Об'єднаних Націй (The Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO) дійшли до висновку, що штами, які входять до складу пробіотиків, в цілому, вважаються безпечними (непатогенними) і мають GRAS статус (Generally Regarded As Safe). Наявність останнього означає, що пробіотики можуть використовуватися без обмеження в харчовій і фармацевтичній промисловості [15].

1.7. Поширення в природі

Lactobacillus plantarum 8P-A3 широко розповсюджений у навколишньому середовищі. Як правило, мікроорганізм зустрічається в умовах надлишку вуглеводів, наприклад, в харчових продуктах (молочних продуктах, ферментованому м'ясі, хлібобулочних виробках) і субстратах рослинного походження. Крім того, даний штам займає багато ніш всередині організму і на поверхні тіла людини: в респіраторному, шлунково-

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

кишковому і урогенітальному тракті. *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 дуже рідко виявляють в ґрунті або водоймах.

Лактобактерії виявлені на всій поверхні рослин, в ризосфері і в прикорневій зоні. У великих кількостях вони присутні в рослинних рештках, що розкладаються, особливо на гниючих фруктах. Бактерії *Lactobacillus plantarum* найбільш часто висіваються з рослин і є природними симбіонтами рослин. Відповідно до теорії Т. Хига, лактобактерії входять в число так званих «ефективних мікроорганізмів» (ЕМ, Effective Microorganisms), які чинять позитивний вплив на рослини і сприяють більш високій врожайності. *Lactobacillus plantarum* ефективний проти біотичних стресорів завдяки своїй високій антагоністичній активності щодо рослинних патогенів. Він захищає рослини від шкідливих бактерій і стимулює ріст пагонів і коренів [16].

Молочнокислі бактерії, а саме бактерії виду *Lactobacillus plantarum* відіграють провідну роль в процесі силосування, причому на останніх стадіях дозрівання (після зниження рН до 5,5) домінують в силосній мікрофлорі.

Lactobacillus plantarum 8P-A3 входить до складу нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту у птиць та ссавців і подібно до інших мікроорганізмів здатний до коменсалізму. Відомо, що даний штам стимулює розмноження і кислотоутворення біфідобактерій. *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 є важливим компонентом мікрофлори організму людини: мікроорганізм виділяють з урогенітального тракту жінок, його також вдається виявити в грудному молоці людини. Але основним середовищем існування даного штаму в організмі є різні відділи шлунково-кишкового тракту, починаючи з ротової порожнини і завершуючи прямою кишкою, при цьому максимальний його вміст спостерігається в товстому кишечнику. У ротовій порожнині *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 становить менше 10^3 - 10^4 КУО / г, шлунку - 10^2 - 10^3 КУО / мл шлункового соку, в тонкому кишечнику – близько 10^3 - 10^4 КУО / мл кишкового соку, в товстому (в залежності від віку) - до 10^9 КУО / г фекалій. У дванадцятипалій кишці даний мікроорганізм разом з ентерококами відноситься до переважаючої мікрофлори [17].

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Цільовий продукт – Лактобактерин належить до пробіотичних лікарських препаратів і випускається у флаконах у формі мікробної маси живого, антагоністично активного штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, ліофілізованої в середовищі культивування з додаванням захисного сахарозо-желатино-молочного середовища. Латинська назва цього препарату *Lactobacterinum sicciuum*. За однією з класифікацій, в залежності від часу створення і удосконалення, препарати пробіотиків, які використовуються нині у клінічній практиці, поділяються на 7 поколінь. У відповідності до такої класифікації Лактобактерин належить до I покоління – пробіотики на основі монокультур облігатної нормофлори. За анатомічно-терапевтично-хімічною класифікацією, або АТС (Anatomical Therapeutic Chemical Classification System) Лактобактерин відповідає коду A07F A01 і відноситься до протидіарейних мікробних препаратів [1].

2.2. Схема хімічних перетворень, що відбуваються в процесі біосинтезу

Для конструктивного метаболізму клітин лактобактерій, зокрема, синтезу пептидоглікану, необхідні гексози. Штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 досить легко ферментує глюкозу, яка входить до складу поживного середовища МРС-1 та яку в процесі культивування періодично подають у ферментер до кінцевої концентрації у казеїно-дріжджовому середовищі 1,5—1,7%. Оскільки *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 належить до факультативно гетероферментативних бактерій, то біохімічні перетворення глюкози в процесі біосинтезу цільового продукту будуть здійснюватися за

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Державцева Ю.І.				Д	21	131
Консульт.								
Керівник		Олійник Н.М.						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського		

гомоферментативним шляхом (шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса). В результаті такого бродіння утворюється переважно молочна кислота (80% і більше) і вкрай невеликі кількості фумарової та бурштинової, летких кислот, етилового спирту і вуглекислого газу. З кожного моля глюкози утворюється 2 молі лактату, при цьому синтезується 2 молекули АТФ (рисунок 2.1.).

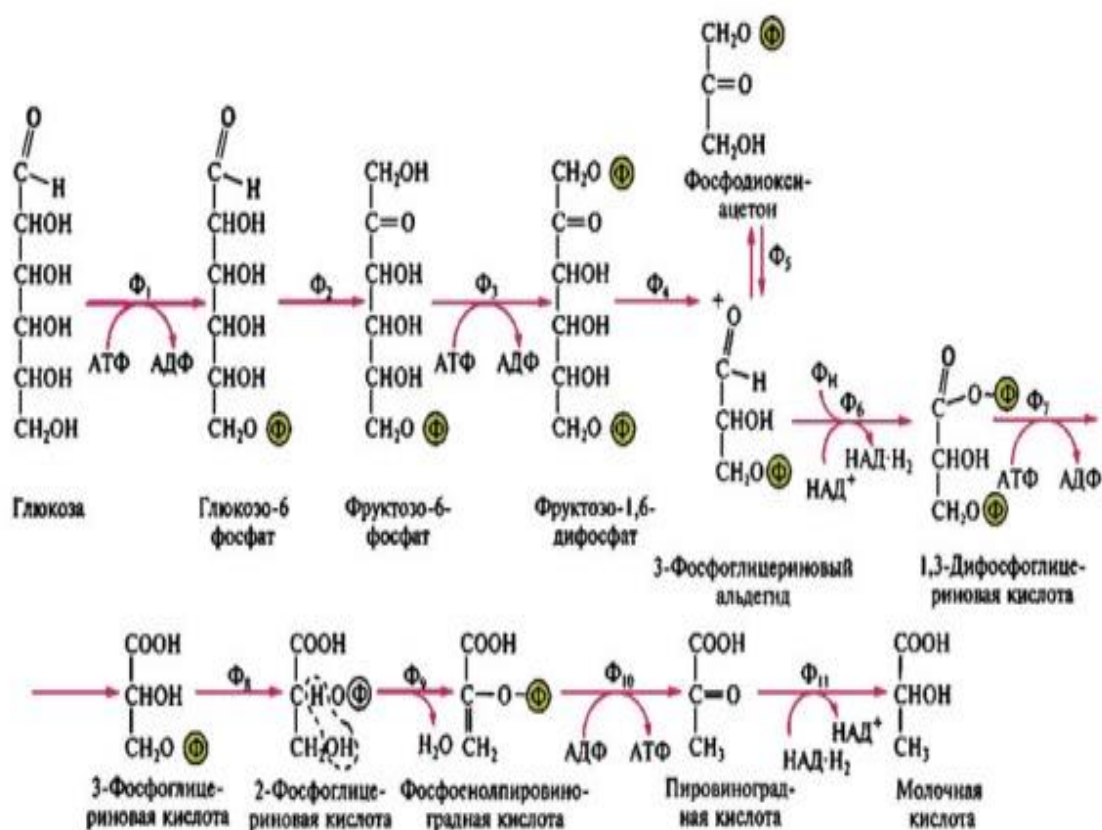


Рисунок 2.1. Гомоферментативне молочнокисле бродіння:

Ф1 – гексокіназа, Ф2 – глюкозофосфатізомераза, Ф3 – фосфоглюкокіназа, Ф4 – фруктозо-1,6дифосфат-альдолаза, Ф5 – тріозофосфатізомераза, Ф6 – 3-ФГА- дегідрогеназа, Ф7 – фосфогліцераткіназа, Ф8 – фосфогліцеромутаза, Ф9 – енолаза, Ф10 – піруваткіназа, Ф11 – лактатдегідрогеназа.

У випадку здійснення виробничого біосинтезу на середовищі КД-5, до складу якого входить дисахарид лактоза у кількості 1,0%, перш ніж вступити на шлях катаболізму, вона повинна бути розщеплена ферментом

галактозидазою до глюкози і галактози. Глюкоза потім фосфорилується з утворенням глюкозо-6-фосфату за гомоферментативним шляхом [18]. Найкраща бродильна активність лактобактерій спостерігається за таких параметрів культивування: рН 5,5-6,0; температура 30-35°C, надлишковий тиск 0,03—0,04 МПа [1].

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Компонентний склад Лактобактерину:

♦ діюча речовина: живий штам лактобактерій *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Одна доза містить не менше $2 \cdot 10^9$ КУО лактобактерій.

♦ допоміжні речовини — препарат крім інгредієнтів середовища культивування містить інгредієнти стабілізуючого середовища сушіння, зокрема:

- сахарозу (ГОСТ 5833—75) або цукор дрібнокристалічний (ТУ 15.8-00372658-005-2004) — від 7 до 10 %;
- желатин (ГОСТ 11293-89) — від 0,7 до 1,0 %;
- молоко знежирене (ДСТУ 2661-94) або згущене знежирене стерилізоване (ДСТУ 4404:2005) — від 15 до 25 % [19].

Вміст основної речовини знаходиться в межах 65-78%, допоміжні речовини становлять приблизно 22-35% готової продукції.

Наявність сторонньої мікрофлори (патогенної, умовно-патогенної) у сухій ліофілізованій формі у флаконах не допускається. Кінцевий продукт має бути мікробіологічно чистим [20].

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.4. Методи очистки цільового продукту

Технологією виробництва пробіотичного препарату Лактобактерину не передбачено використання методів очистки. Основною задачею є отримання концентрованої мікробіологічно чистої біомаси клітин лактобактерій [1].

2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Механізм дії Лактобактерину на біохімічні процеси організму людини можна описати наступним чином:

1. Лактобактерії, що потрапляють в організм у складі пробіотичного препарату, адгезують до епітеліоцитів кишечника і створюють додатковий бар'єр на їх поверхні, який запобігає транслокації патогенної і умовно-патогенної мікрофлори кишечника у внутрішнє середовище організму.

2. *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 при потраплянні в організм починає активно розмножуватися в просвіті товстого кишечника. При цьому накопичені в середовищі культивування бактеріоцини, металопротеїнази, специфічні адгезини блокують і дезінтегрують умовно-патогенну і патогенну мікрофлору [9].

Антагонізм лактобактерій щодо сторонніх мікроорганізмів обумовлений утворенням молочної кислоти, продукуванням інших антимікробних і антибіотикоподібних субстанцій: лізоциму, перекису водню, бактеріоцинів (лактацинів), коротколанцюгових жирних кислот, діацетилу. Активне кислотоутворення розглядається як один з важливих факторів антагонізму по відношенню до інших видів мікроорганізмів. Однак здатність *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 до продукування перекису водню розцінюється як переважаючий чинник у механізмі прояву антагоністичної активності в порівнянні з дією органічних кислот. Прояв бактерицидної дії перекису водню відносно грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, наприклад проти стафілококів і псевдомонад, обумовлений сильною

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

окиснювальною дією відносно структури білкових молекул мікроорганізмів [21].

Штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 продукує лізоцим, що в поєднанні з лізоцимом слизової оболонки кишечника сприяє стійкості останньої до дії патогенної мікрофлори. Даний штам синтезує також бактеріоцини: лактолін, плантарицин А і С, плантацин 154. Основним механізмом антибактеріальної дії плантарицинів є порушення цілісності цитоплазматичної мембрани шляхом пороутворення, що призводить до нерегульованого виходу з клітини іонів калія, амінокислот та інших низькомолекулярних речовин і як наслідок загибелі клітин-мішеней [22].

Коротколанцюгові жирні кислоти, які продукуються лактобактеріями, беруть участь у секреції слизу, регуляції іонного обміну, пригніченні умовно-патогенної мікрофлори і стимулювальному впливі на цукролітичні бактерії, інактивації шкідливих метаболітів і ферментів. Вони відіграють важливу роль в енергетичному і конструктивному обміні епітелію, впливають на проліферацію та диференціювання його клітин, беруть участь у мікроциркуляції, активізують місцевий імунітет, блокують адгезію до епітелію умовно-патогенних мікроорганізмів [1].

Імуномодулювальна дія лактобактерій виявляється у підвищенні фагоцитарної активності макрофагів і нейтрофілів; стимуляції утворення секреторного IgA; підвищенні вмісту цитокінів; продукції α -, β - і γ -інтерферонів. Призначення дітям з дефіцитом секреторного імуноглобуліну А пробіотику Лактобактерину сприяє регуляції системи місцевого імунітету і ферментативних функцій слизових шлунково-кишкового тракту [23].

У регуляції процесів обміну *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 відіграє таку роль: зброджування вуглеводів з утворенням коротколанцюгових жирних кислот; синтез ферментів глікозидаз (α - та β - глікозидаза, α - та β - галактозидаза, β -глюкуронідаза), які розщеплюють вуглеводи, що не всмоктуються у тонкій кишці; протеаз, які руйнують ферменти травлення; ліпаз, що завершують гідроліз жирів; продукування вітамінів А, В, С і К;

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						25
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

детоксикації екзогенних та ендогенних субстратів за рахунок біотрансформації та абсорбції [24].

Разом з лактококами, біфідобактеріями та іншими молочнокислими бактеріями резидентної кишкової мікрофлори, *Lactobacillus plantarum* має здатність зв'язувати гетероциклічні аміни, які утворюються при термічній обробці продуктів [25].

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						26
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи

Геном *Lactobacillus plantarum* є найбільшим серед всіх молочнокислих бактерій і його послідовність повністю визначена методом секвенування. Геном даного виду представлений в базі даних EMBL під інвентарним номером AL935263 [26].

Lactobacillus plantarum 8P-A3 містить одну кільцеву хромосому, що складається з 3 308 274 пар основ. Виявлено, що даний штам містить дві криптичні плазмиди малого розміру (2 365 та 1 917 п.н.) і більшу плазмиду (36069 п.н.), що кодують гени, які беруть участь в перенесенні кон'югативних плазмід і виконують кілька інших функцій. Загальний вміст G + C в хромосомі становить 44,5%, тоді як плазмиди, припускають, мають більш низький вміст G + C [27].

Точка початку реплікації була ідентифікована завдяки гомології з хромосомами *Bacillus subtilis* і *Bacillus halodurans*, в яких організація генів навколо цієї ділянки ідентична. У *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 12 з 14 генів в цьому регіоні є ортологами даних видів *Bacillus*, організованих і орієнтованих однаково. Також GC-зміщення показує різкий перехід в цій області.

Гени, які кодуються геномом *Lactobacillus plantarum*, переважно транскрибуються в напрямку реплікації, що є ознакою, яка спостерігається в багатьох геномах грампозитивних бактерій з низьким рівнем G + C [28]. Кінець реплікації, ймовірно, розташований діаметрально протилежно до

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Державцева Ю.І.				РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	27	131
						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Керівник	Олійник Н.М.							
Затвер.								

точки оріджину і характеризується різким переходом в GC-перекіс (рисунок 3.1).

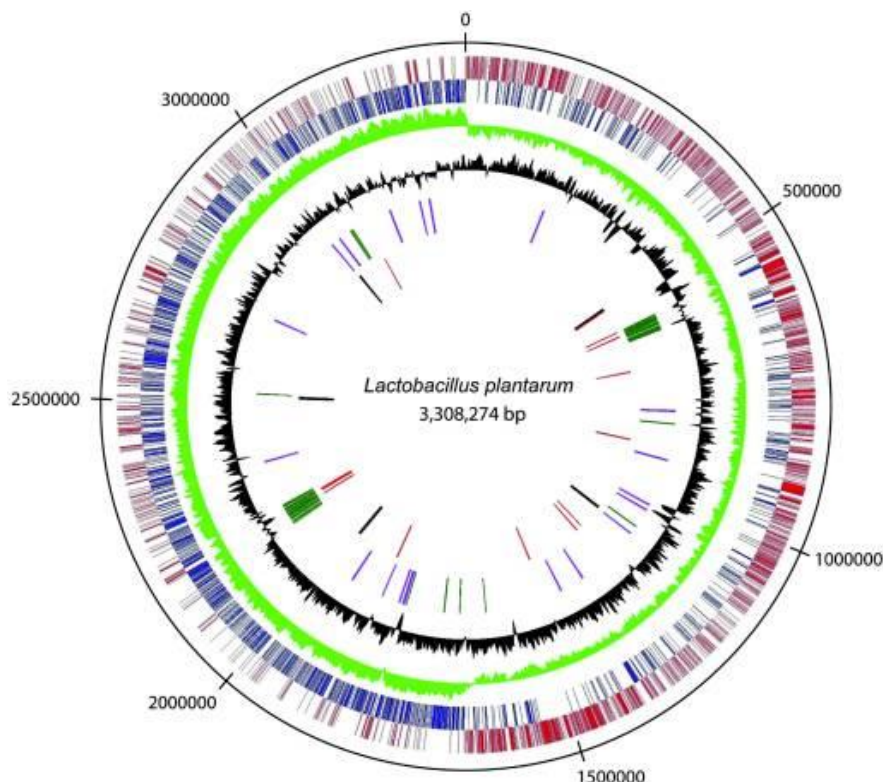


Рисунок 3.1. Генетична карта хромосоми *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 з точкою початку реплікації на вершині кола (0). Зовнішні кола відображають: позитивні ланцюги відкритої рамки зчитування (червоний колір), негативні ланцюги відкритої рамки зчитування (синій колір), GC-зміщення (зелений колір), вміст G + C (чорний колір). У внутрішній частині кола чорного кольору гени, що кодують функції пов'язані з профагом позначені зеленим кольором, IS-елементи - фіолетовим; оперони рДНК - чорним і гени, що кодують тРНК –червоним [27].

Геном *Lactobacillus plantarum* містить п'ять оперонів рРНК, які рівномірно розподілені по хромосомі. Всього було ідентифіковано 62 гена, що кодують тРНК, більшість з яких, вважають, генетично пов'язані з деякими кластерами рРНК. Було знайдено кілька інших повторюваних елементів послідовності, включаючи два класи ділянок, що кодують транспозазу, та які,

ймовірно, представлені мобільними генетичними елементами. Ці повторювані послідовності були позначені ISP1 і ISP2. ISP1 являє собою класичний IS-елемент, що містить ген, кодує транспозазу, має кінцеві інвертовані повтори, та розділяє гомологію з відомим IS1165 *Leuconostoc mesenteroides*. Вважається, що в ISP2 відсутні кінцеві інвертовані повторювані послідовності, але він може кодувати білок з гомологією до транспозази в сімействі мобільних генетичних елементів *Staphylococcus aureus*. Ідентифіковано 3052 гени, що кодують білок, з яких тільки 39 виявилися псевдогенами. Порівняння передбачуваних білків з білками інших повністю секвенованих геномів показало, що білки *Lactobacillus plantarum* найбільш подібні до білків інших грампозитивних бактерій з низьким вмістом G + C (роди *Listeria*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* тощо). Біологічні функції були визначені для 2120 білків, ще 588 білків в *Lactobacillus plantarum* є гомологічними консервативним білкам, що виконують невідомі функції в інших організмах. Решта 344 гіпотетичних білки не мали збігів в базі даних, 57 з цих білків вважаються мембранними білками, а інші 111 містять менше 100 амінокислот [29, 30, 31].

Lactobacillus plantarum є універсальним організмом, що здатний рости на найрізноманітніших джерелах вуглеводного живлення. Ця фенотипова ознака зумовлена великою кількістю генів, що кодують транспортери цукрів. Більшість цих переносників є фосфоенолпіруват-залежними вуглеводами фосфотрансферазної системи. *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 кодує 25 повних ферментативних комплексів і кілька неповних комплексів фосфотрансферазної системи. Така кількість являється набагато більшою, ніж в інших мікробних геномах. При дослідженні геному даного штаму було виявлено також, що гени, які кодують ферменти шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, організовані в два оперони. Цей генетичний зв'язок сприяє ефективній узгодженій регуляції експресії таких ферментів у відповідь як на рівень, так і на тип джерела цукру, наявного в середовищі [32].

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Більшість генів, необхідних для транспорту і метаболізму цукрів згруповані поблизу точки початку реплікації (рисунок 3.2). Зокрема, область розміром 213 т.п.н. від 3 072 500 до 3 285 500 пар основ кодує майже виключно білки для транспорту, метаболізму і регуляції вмісту цукру. Більше того, увесь цей регіон має порівняно більш низький вміст GC (41,5%), ніж інша частина геному (рисунок 3.1), що дозволяє припустити, що велика кількість генів була отримана шляхом горизонтального переносу. До даної області прилягає ділянка, яка кодує позаклітинні білки (від 2 604 000 до 3 063 000 пар основ). Хромосома кодує понад 200 позаклітинних білків, більшість з яких, за прогнозами, зв'язані з клітинною оболонкою. Обидві ділянки підтверджують те, що дана частина хромосоми *Lactobacillus plantarum* являє собою область адаптації до способу існування та використовується для ефективного пристосування до змін умов в численних екологічних нішах, в яких виявлено досліджуваний мікроорганізм [27].

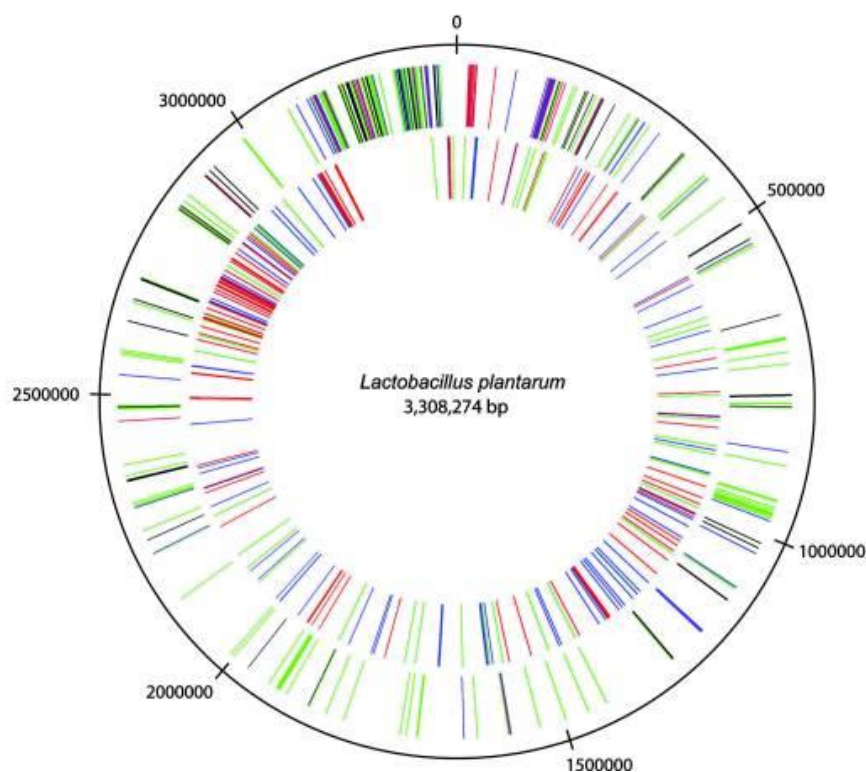


Рисунок 3.2. Розподіл генів за функціональними категоріями в хромосомі *Lactobacillus plantarum*. В зовнішньому колі розташовані всі гени, що кодують білки-переносники цукрів (фосфотрансферазна система

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

забарвлена в чорний колір, інші транспортери – в синій), метаболізм цукрів (зелений колір) і біосинтез або деградацію полісахаридів (червоний) [27].

Геном *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, як свідчать дослідники Крістенсен і Педерсон, не кодує первинний фермент, необхідний для розщеплення великих поліпептидів (білків), а саме позаклітинну протеазу. Однак даний штам володіє системами утилізації пептидів (Opp і Dtp), які є основними продуктами розпаду білка. *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 має 19 генів, що кодують внутрішньоклітинні пептидази різної специфічності [33]. Також в геномі досліджуваного штаму був виявлений генний кластер нерибосомального пептидного синтезу (NRPS) розміром 25 т.п.н., який є першим прикладом такого біосинтетичного механізму в молочнокислих бактерій. Ще досить важливою є наявність кластера з 25 генів, що відповідають за біосинтез різних бактеріоцинів (зокрема, плантарицинів), які здійснюють значний вплив на антагоністичну активність пробіотичного штаму [34].

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

В селекційній роботі з лактобактеріями застосовують відбір природних штамів, що володіють цінними ознаками, які проявляються в конкретних умовах їх існування. При розмноженні такої культури (з урахуванням частоти спонтанних мутацій) проявляється популяційний тиск, коли найбільш пристосована форма витісняє вихідну в популяції. Для аналізу таких популяцій використовують 2 способи: флуктуаційний тест і метод відбитків. За допомогою першого доводять спонтанність мутацій за маркерною ознакою, за допомогою другого відбирають потрібні колонії, які

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						31
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

виростають на селективному середовищі. Даний підхід спирається на природне протікання розвитку мікроорганізмів роду *Lactobacillus* в змінених умовах (природний відбір).

Можливий також штучний відбір клонів мікроорганізмів *Lactobacillus plantarum* з корисними для створення пробіотиків ознаками, що виникли на основі природної мінливості батьківських форм. До такого відбору вдаються тоді, коли контрольована ознака є біологічно малоцінною для мікроорганізму і тому важко створити в природі умови вирощування культури, в яких відносно легко вдавалося б виділяти потрібні варіанти. При цьому необхідно перевіряти велике число клонів і субклонів, і якщо варіації між ними за контрольованою ознакою невеликі, то успішність такої вибірки виявляється малоімовірною.

Використання природного та штучного добору як підходів у селекційній роботі має місце, але підвищити за допомогою таких методів синтез цільового продукту, в даному випадку накопичення біомаси бактерій *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 не вдається [35].

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Індукований мутагенез – більш ефективний і доступний для практичного використання метод штучного відбору мікроорганізмів роду *Lactobacillus*. За допомогою мутагенів збільшується мінливість тест-культур, і серед останніх відбирають найбільш перспективні для виготовлення пробіотику. Такий підхід, як правило, використовують багаторазово (ступінчасто), досягаючи істотного зростання контрольованого показника (продуктивність досліджуваного штаму, збільшення швидкості утилізації субстрату клітинами тощо).

Метод отримання промислових продуцентів за допомогою індукованого мутагенезу складається з наступних етапів:

- вибір та виділення вихідного організму для селекції;

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						32
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

• підготовка вихідного штаму до селекційної роботи (чистка та стабілізація культури);

• обробка штаму мутагенними факторами;

• відбір одержаних мутантів [36].

Зовнішнє середовище є потужним фактором еволюції і мінливості мікроорганізмів. Відповідно, виділення з природних джерел штамів лактобактерій вважається доцільним. На підставі багаторічної роботи дослідників із селекції мікроорганізмів для виділення молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* можуть бути рекомендовані наступні джерела: сире молоко, солодковершкове масло, сири, самоквасні кисломолочні продукти (сметана, ряжанка, кисле молоко, кефір і т.д.), а також ґрунт, коренева система рослин, квіти (польові, лісові, садові), овочі (свіжі та квашені), фрукти (свіжі і висушені). Розглядаючи джерела існування молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum*, Л.А.Баннікова зазначає, що ґрунт і коренева система рослин через високу забрудненість споровими видами бактерій не є хорошими джерелами виділення молочнокислих бактерій, навіть при додаванні в поживне середовище етилового спирту, з метою пригнічення росту сторонньої мікрофлори. Ризосферу рослин необхідно використовувати здебільшого при пошуку рідкісних форм молочнокислих бактерій, а також їх нових різновидів [37].

При виділенні штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 перевагу ж надають біотопам людини. Даний мікроорганізм виділяють із шлунково-кишкового тракту та ротової порожнини здорових дітей і дорослих різного віку й статі. У процесі відбору особливу увагу звертають на властивості, що забезпечують активність штаму у певному біотопі: резистентність до шлункового соку, жовчі, фенолу, хлориду натрію, ферментів травлення, лізоциму, антибіотиків, антагонізм щодо патогенної та умовно патогенної мікрофлори, рівень кислотоутворення, синтез полісахаридів, метаболізм холестерину тощо. Оскільки в межах мікробної екосистеми організму людини вид *Lactobacillus plantarum* не завжди займає переважаюче становище, тому для його

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						33
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

виділення використовують елективні поживні середовища, що сприяють росту даного виду і пригнічують ріст супутньої мікрофлори. Таким чином, отриманню високопродуктивного штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 передуює спочатку отримання накопичувальної культури молочнокислих бактерій, а потім - виділення чистої культури мікроорганізму на щільних поживних середовищах, що продемонстровано на рисунку 3.3.



Рисунок 3.3. Схема виділення бактерій виду *Lactobacillus plantarum*[38]

Отримання накопичувальної культури молочнокислих бактерій відбувається з використанням елективних поживних середовищ, тобто в даному випадку середовищ з слабо кислим рН (MRS, Рогоза). Посів на рідкі елективні середовища можна проводити безпосередньо зі зразка, що містить лактобактерії, або зі змиву з нього. Другий спосіб частіше використовують при виділенні мікроорганізмів з рослинного матеріалу.

Чисту культуру *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 виділяють за допомогою щільних поживних середовищ, на яких отримують окремі колонії культур,

які вважають результатом розвитку однієї клітини. Шляхом пересіву окремих колоній вдається виділити чисті культури. Щоб отримати окремі колонії на щільному поживному середовищі, попередньо проводять послідовні розведення (в стерильній водопровідній воді або фізіологічному розчині) з таким розрахунком, щоб при посіві на поживне середовище вирости ізольовані колонії. Суть методу розведень відображена на рисунку 3.4.

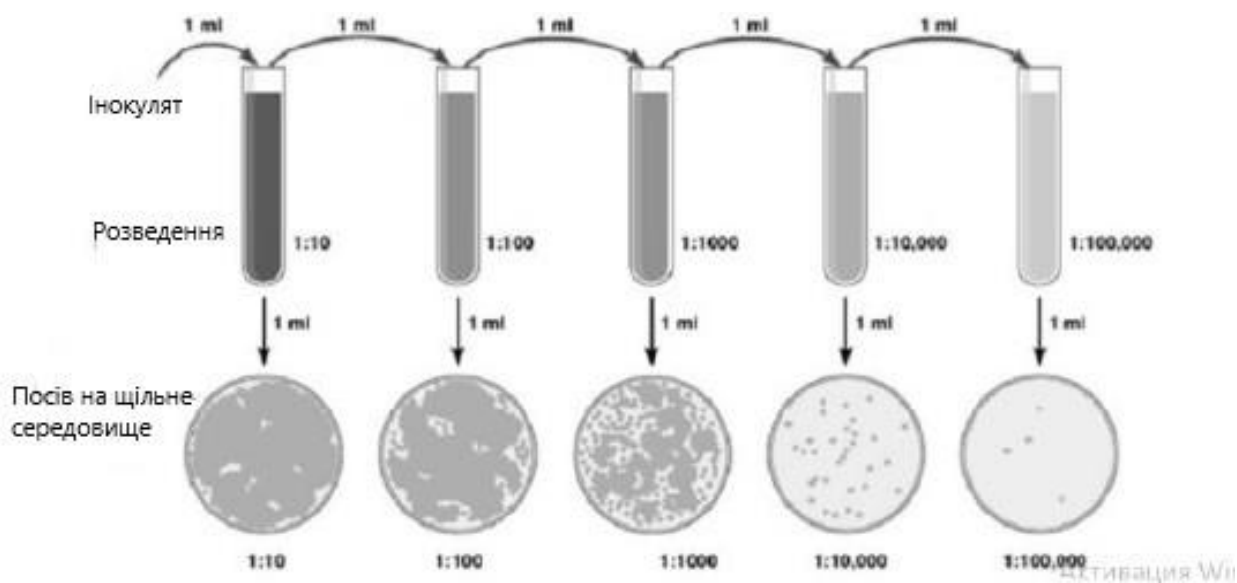


Рисунок 3.4. Метод послідовних розведень [38]

Висів на щільні середовища з пробірок з розведеннями можна проводити двома способами:

а) метод поверхневого посіву (рисунок 3.5): розплавлене і охолоджене до 45-50°C щільне поживне середовище розливають в стерильні чашки Петрі в такій кількості, щоб дно чашки було повністю покрито (15-20 мл). Чашку залишають на горизонтальній поверхні до тих пір, поки не застигне середовище. Для посіву відкривають кришку чашки Петрі і на поверхню щільного середовища наносять піпеткою / дозатором 100 мкл рідкої культури. Швидко розподіляють краплю по поверхні середовища за допомогою скляного стерильного шпателя Дригальського.

б) метод глибинного посіву (рисунок 3.5): у випадку штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (оскільки він факультативний анаероб) цей спосіб є більш прийнятним. У стерильну чашку Петрі вносять піпеткою / дозатором 1 мл рідкої культури, після чого наливають 15-20 мл розплавленого і охолодженого до 45°C щільного поживного середовища, обережно перемішують і залишають чашку на горизонтальній поверхні до тих пір, поки не застигне середовище [38].

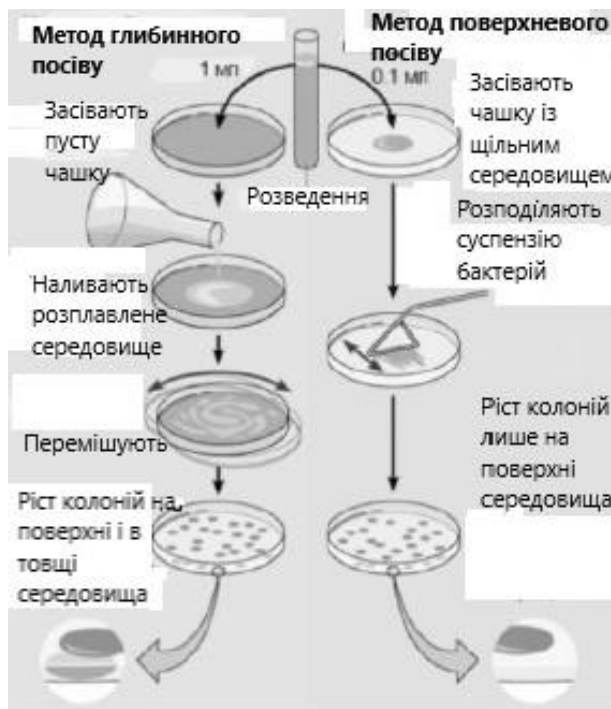


Рисунок 3.5 – Методи поверхневого і глибинного посіву [38]

Інкубування триває 24-48 год при оптимальній для досліджуваного штаму температурі 37°C.

Щільним елективним середовищем для отримання чистої культури в даному випадку є середовище приготоване за методом Нетрусова наступного складу:

- рослинний відвар свіжої капусти - 1000 мл;
- дріжджовий автолізат – 10 г;
- пептон - 10 г;
- глюкоза – 20 г;

агар – 2%;

подрібнена крейда – 4%.

Після проведення чистки культури відбувається оцінювання отриманих клонів за швидкістю поглинання і утилізації субстрату. *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 при зростанні на даному середовищі утворюють навколо колоній зони просвітління, обумовлені перетворенням нерозчинного вуглекислого кальцію в розчинний лактат кальцію. Далі відбирають один клон, який відрізняється високою біохімічною активністю і відповідно швидше ферментує глюкозу із елективного середовища до молочної кислоти, що проявляється у швидкості утворення зони просвітлення і її якісних характеристиках [39].

Наступним кроком у підготовці штаму до селекційної роботи є стабілізація культури. Проводять розсів виснажуючим штрихом відібраного найбільш продуктивного клону на чашки Петрі для отримання близько 100 колоній. Культуру відбирають петлею і на поверхні щільного середовища проводять штрихи (рисунок 3.6 а). Отримати окремі колонії можна кількома способами:

а) розділити чашку на 4 сектори і провести штрихи в кожному з секторів, як показано на рисунку 3.6. б.

б) провести посів штрихом по всій поверхні чашки так, щоб штрих був більш частим на початку посіву і більш рідким - в кінці (рисунок 3.6.в).

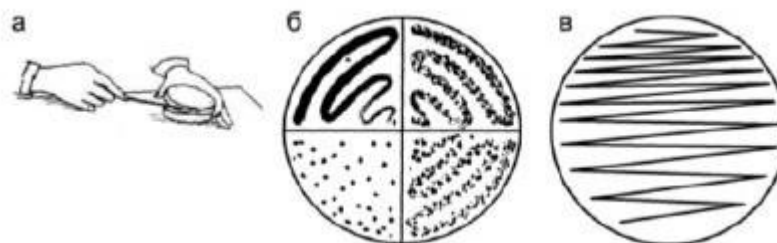


Рисунок 3.6. - Схема розсівання культури мікроорганізмів на поверхню щільного середовища петлею при посіві виснажуючим штрихом [38].

в) провести штрихи в порядку, зазначеному на рисунку 3.7. Перед кожним новим штрихом петлю потрібно стерилізувати в полум'ї пальника.

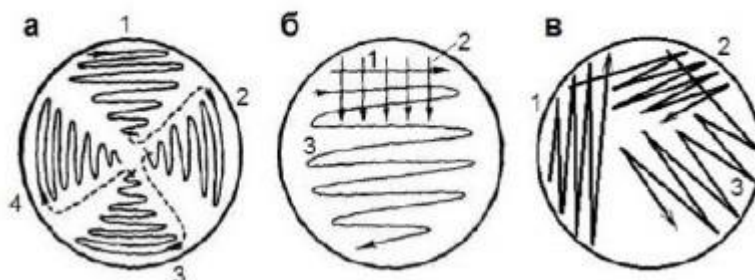


Рисунок 3.7. - Схема розсівання культури мікроорганізмів на поверхню щільного середовища петлею при посіві виснажуючим штрихом [38].

Після посіву чашки Петрі поміщають в термостат кришками вниз, щоб конденсаційна вода, що утворилася на кришці при застиганні агару, не завадила отримати ізольовані колонії. Інкубування триває 24-48 год при оптимальній для досліджуваного штаму температурі 37°C [38].

В отриманих колоній оцінюють можливі морфологічні зміни та досліджують швидкість поглинання і утилізації субстрату як вже було описано вище. Вивчають мікроскопічну картину і колонії, що мають нерівномірні за розміром клітини, інволюційні форми клітин або забруднені сторонньою мікрофлорою, відбраковують. Для отриманих колоній розраховують статистичні показники (середнє арифметичне – \bar{X} , квадратичне відхилення – σ , коефіцієнт варіації – cv) і будують варіаційний ряд. Найбільш оптимальним для створення високопродуктивного промислового продуценту пробіотику Лактобактерину буде вважатися клон штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 з гомогенною популяцією клітин, з одновершинною кривою розподілу та коефіцієнтом варіації до 10%. Ця популяція буде слугувати надійним контролем індукованої мутагенами мінливості при подальшому відборі мутантів. Далі проводять повторну перевірку досліджуваного штаму:

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

відбір найпродуктивнішого субклубу, його розсів, оцінювання та порівняння двох варіаційних рядів.

Обраний найбільш продуктивний субклуб в подальшому піддають обробці мутагенними факторами для підсилення здатності до накопичення біомаси клітин. Спадкові зміни (мутації) властивостей мікроорганізмів можуть відбуватися під впливом хімічних і фізичних факторів (іонізуюче випромінювання і ультрафіолетові промені). При радіаційній селекції використовують переважно гамма-промені і швидкі нейтрони, які дають кращий мутагенний ефект. Однак їх використання для отримання промислових штамів продуцентів обмежено. Ультрафіолетові промені з довжиною хвилі 265 нм володіють також хорошою мутагенною дією, так як промені цієї довжини хвилі вибірково поглинаються молекулами ДНК. Ультрафіолетові промені викликають збудження молекули, що в подальшому призводить до їх хімічної зміни.

Хімічні мутагени більш ефективні за кількістю мутацій, ніж фізичні, і часто володіють більш тонкою і специфічною дією на бактеріальну клітину. Хімічні мутагени дають значно більше корисних мутацій, ніж фізичні, будучи в той же час менш летальними [40].

Для отримання мутантів виду *Lactobacillus plantarum* використовують нітрозосполуки, етиленімін, ультрафіолетові промені, рентгенівські промені і дію електромагнітних хвиль. Застосовують також поєднання фізичних і хімічних мутагенних факторів.

Найбільш розповсюдженими методами для обробки продуценту Лактобактерину мутагенами є:

- 1) комбінована дія етиленіміну та ультрафіолетових променів на штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 ;
- 2) комбінована дія N-нітрозоетилсечовини та ультрафіолетових променів на штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 ;
- 3) адаптація штаму до електромагнітного впливу.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

1) Спочатку відбувається нарощування клітин досліджуваного штаму на середовищі гідролізованого молока з 2,5% дріжджового автолізату при оптимальній температурі протягом 17-18 год. Отриману культуру наносять на скошене щільне поживне середовище, посіви терmostатують за температури 37°C. Після цього клітини змивають з поверхні середовища стерильним фізіологічним розчином. Суспензію клітин поміщають в стерильні центрифужні пробірки, які закривають поліетиленовою плівкою, закріплюючи її гумкою. Пробірки центрифугують, зливають надосадову рідину, струшують осад, додають стерильну дистильовану воду і знову центрифугують. Таку операцію повторюють двічі. В результаті отримують клітини, відмиті від залишків середовища. З відмитих клітин в стерильній дистильованій воді готують суспензію клітин, що містить від 500 000 до 1 000 000 клітин в 1 мл за стандартом мутності.

При комбінованій дії етиленіміна і ультрафіолетових променів спочатку суспензію клітин піддають дії етиленіміна, а потім ультрафіолетових променів. Розчин етиленіміна готують на дистильованій воді безпосередньо перед використанням. Для цього вміст ампули (0,1 мл) переносять в стерильну мірну колбу на 200 мл, додаючи дистильовану воду до мітки. Цей розчин має концентрацію 1: 2000. Потім в стерильну пробірку відбирають 0,65 мл розчину етиленіміна, 1,35 мл стерильної дистильованої води і 8 мл суспензії клітин *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Отримують концентрацію етиленіміна в суміші 0,033%. Суміш поміщають в термостат, де витримують близько 60 с.

Для зняття залишкової дії етиленіміна суміш центрифугують. Надосадову рідину зливають, клітини струшують і додають дистильовану воду (10 мл). Після перемішування суміш поміщають в чашки Петрі (по 5 мл), які встановлюють в бокс, де їх відкривають і опромінюють ультрафіолетовими променями (лампою БУВ-15 на відстані 30 см протягом 15-45 с). При опроміненні вміст чашки перемішують рівномірним обертальним рухом. Чашки з опроміненою суспензією клітин *Lactobacillus*

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

plantarum 8P-A3 закривають світлонепроникним папером і залишають на 1 год при кімнатній температурі.

Після закінчення витримки роблять глибинний посів суспензії клітин на щільне поживне середовище з крейдою. Розведення суспензії проводять з розрахунку, щоб на чашці виросло 50 колоній. Чашки з посівами витримують в термостаті при оптимальній температурі для досліджуваного штаму протягом 3 діб, а потім додатково 1-2 доби при кімнатній температурі.

Серед отриманих колоній відбирають ті варіанти, які утилізують субстрат не довше ніж 24 год (проводять аналіз зон просвітління навколо колоній), решту відбраковують. Відібрані варіанти знову пересівають на щільне поживне середовище з крейдою. При цьому відбирають всі мутанти, які ферментують глюкозу до молочної кислоти не більше 17 год.

Використання комбінованої дії етиленіміну та ультрафіолетових променів на штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 дозволяє значно підвищити його біохімічну активність, але при цьому може призвести до зміни видових властивостей культури (вплив на в'язкість клітин).

2) Методика проведення обробки штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 комбінованою дією N-нітрозоетилсечовини та ультрафіолетових променів є аналогічною до способу наведеному у пункті 1) [41].

3) Застосування впливу електромагнітних хвиль на штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 дозволяє отримати мутанти, що значно відрізняються від вихідного батьківського штаму за фізіологічними властивостями. Електромагнітне поле – це мутаген, що є потужним стресовим фактором для популяції клітин лактобактерій, дія якого призводить до «увімкнення» неспецифічних сигнальних систем в клітині. В передачу сигналу всередині клітини в багатьох випадках, крім білкових посередників, залучаються і відносно невеликі молекули, що слугують вторинними сигналами, типу іонів кальцію (Ca^{2+}). В цей період відбувається підвищення інтенсивності метаболізму, у тому числі шляхом виділення молочної кислоти у зовнішнє середовище. Кислотність середовища відповідно знижується до 4,0.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

Методика полягає у дії низькочастотних електромагнітних полей, створюваних кільцями Гельмгольца, що забезпечують однорідне (до 5%) магнітне поле в зоні розташування скляних колб із клітинами продуценту Лактобактерину, які знаходяться у рідкому середовищі МРС-1. Тривалість впливу електромагнітного поля становить 3 години. Дослід проводять у двох повторностях: суспензію клітин *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 в однаковій кількості розподіляють між двома колбами з поживним середовищем. Перед початком експерименту проводять точне зважування обох колб. Одна з них слугуватиме контрольним зразком і знаходитиметься за нормальних умов, інша ж колба з досліджуваним зразком буде підлягати дії низькочастотних електромагнітних полей. Через три години після початку дослідження проводять повторне зважування колб із клітинами штаму-продуценту. Аналіз існуючих результатів аналогічних експериментів наведено в таблиці 3.1 [42].

Таблиця 3.1. Порівняння результатів впливу/відсутності впливу електромагнітних хвиль на штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 [42]

	Досліджуваний зразок	Контрольний зразок
Початкова маса колби із суспензією клітин та середовищем МРС-1, г	500	500
Маса колби після завершення експерименту, г	621	516
Приріст біомаси, г	121	16
Приріст біомаси, %	24,2	3,2

Після завершення дії електромагнітних хвиль отриману культуру наносять на чашки Петрі із щільним поживним середовищем для перевірки життєздатності клітин, посіви термостатують за температури 37°C. На щільних поживних середовищах колонії ростуть радіально, тому навіть якщо в одній з клітин відбудеться мутація, її легко виявити візуально. Отримані мутанти продукують кремовий пігмент, який в подальшому набуває вся

колонія. Колонії, сформовані під дією стресора, зазвичай більш щільно прилягають до агаризованого середовища та більш інтенсивно забарвлені. Припускають, що цей пігмент являє собою високомолекулярну сполуку фенольної природи (меланін), яка, як відомо, має виражені антиоксидантні властивості. Можливо, пігмент вносить суттєві зміни в архітектуру мембран і впливає на стан ліпідів, так як колонії набувають чітко окреслений край [43].

Оскільки поряд із накопиченням життєздатної біомаси клітин досить важливим показником придатності отриманих мутантів для використання при виробництві Лактобактерину є антагоністична активність, тому проводять її визначення *in vitro* методом дифузії в агар, використовуючи при цьому стерильні паперові циліндрики. Згідно з методом, по 1 мл суспензії мутантного штаму вносили в циліндрики, встановлені на щільному поживному середовищі, засіяному тест-культурами в чашках Петрі. В якості тест-культур були обрані по 5 штамів роду *Enterobacter*, атипової кишкової палички *Escherichia coli* і золотистого стафілокока *Staphylococcus aureus*. Вибір обумовлений тим, що дані мікроорганізми, будучи постійними супутниками організму людини, в ряді випадків здатні спричиняти різні порушення мікробної екології людини. Оцінювання результатів проводять виміром розміру зони затримки росту за допомогою лінійки. Зони стерильності склали по відношенню до *E. coli* - від 27 до 31 мм; відносно роду *Enterobacter* – від 21 до 26 мм, а по відношенню до *Staph. aureus* - від 25 до 29 мм. Це свідчить про те, що досліджувані мутанти *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 мають високу антагоністичну активність по відношенню до представників патогенної та умовно-патогенної мікрофлори [44].

Отже, зміна біохімічної активності клітин і збільшення швидкості утилізації субстрату та накопичення молочної кислоти роблять даний метод найбільш сприятливим для отримання промислового продуценту Лактобактерину і дозволяють підвищити накопичення біомаси клітин.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						43
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів Лактобактерину

Мікроорганізми роду *Lactobacillus* відносяться до числа бактерій, для яких не розроблено ефективних методик трансформації, трансдукції та злиття протопластів. Тому для введення ДНК в їх клітини досить часто застосовують метод кон'югативної мобілізації.

Науковцями проводилися дослідження для досягнення максимальної частоти кон'югативної мобілізації при міжродовому схрещуванні між *Escherichia coli* і молочнокислими бактеріями *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. З цією метою було оптимізовано умови її проведення, та як наслідок визначено, що максимально ефективно кон'югативна мобілізація між кишковою паличкою і лактобактеріями проходить при "потрійному" схрещуванні, тобто коли в якості донора використовуються одночасно два штами: один - з мобілізованою плазмідною, інший - з плазмідною-помічником. Крім того, схрещування має проводитися на мембранних нітроцелюлозних фільтрах. Час спільного інкубування має становити 24 години, співвідношення донор - реципієнт відповідає 3: 1.

Такі маніпуляції проводилися для отримання штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, стійкого до антибіотику хлорамфеніколу. За допомогою кон'югативної мобілізації було введено плазмиду PLF21, що переносить ген хлорамфеніколацетилтрансферази в пробіотичний штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Плазміда pLF21 була структурно стабільною в даному мікроорганізмі, що підтверджено за допомогою рестрикції і аналізу плазмиди при електрофорезі в агарозному гелі. Сегрегаційна стабільність плазмиди підтримувалася на досить високому рівні і становила для досліджуваного штаму 87%.

Отримані мутантні штами молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 є стійкими до хлорамфеніколу, проте характеризуються

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						44
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

уповільненою швидкістю росту і зниженою життєздатністю, що вважається недопустимим для пробіотичних штамів [45].

3.2.4. Регуляція метаболізму у мікробній клітині

До теперішнього часу не реалізовані можливості, які б дозволяли створити високопродуктивний промисловий продуцент *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 завдяки регулюванню метаболізму мікробної клітини.

3.2.5. Використання особливих методів, що застосовуються для отримання продуцентів для даної технології і не застосовуються в інших

При проведенні літературного огляду особливих методів, що застосовуються для отримання продуценту для технології виробництва Лактобактерину і не застосовуються при отриманні інших пробіотичних препаратів, не виявлено.

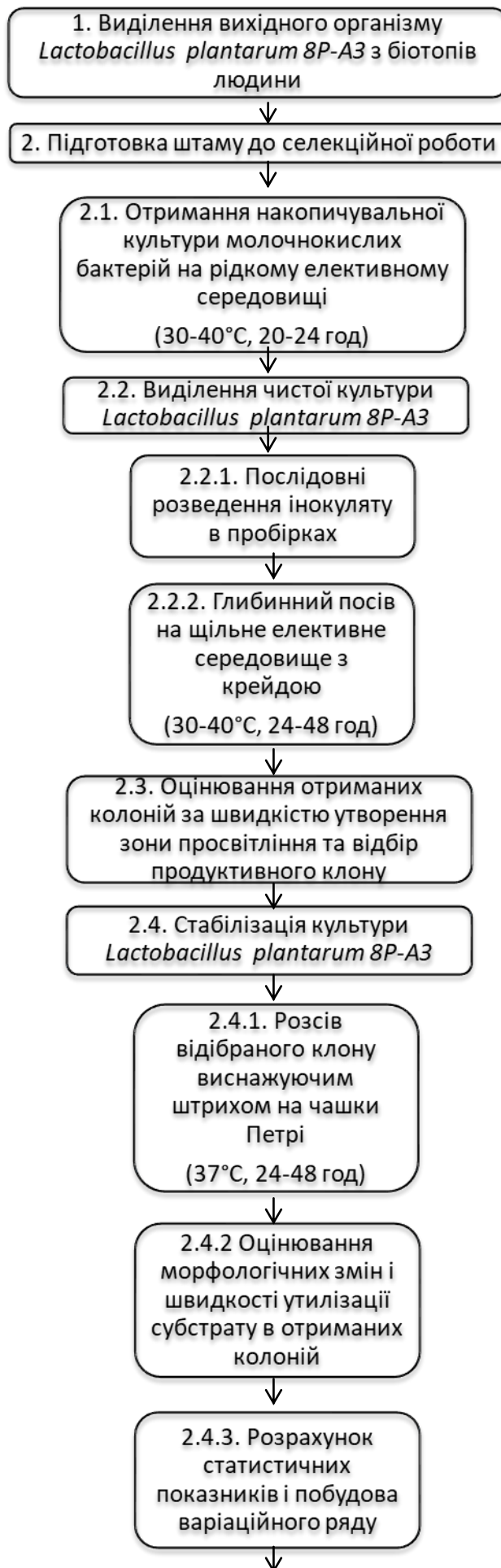
3.2.6. Використання методів генної та клітинної інженерії

Використанню молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* в якості об'єктів для генної та клітинної інженерії перешкоджає слабка порівняно з іншими класичними об'єктами (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*) генетична вивченість і відсутність відповідних векторів для клонування. Такі методики є трудомісткими і малоефективними при конструюванні пробіотичного штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 [46].

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Для отримання промислового штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 було запропоновано метод індукованого мутагенезу з використанням в якості мутагенного фактору низькочастотного електромагнітного впливу.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

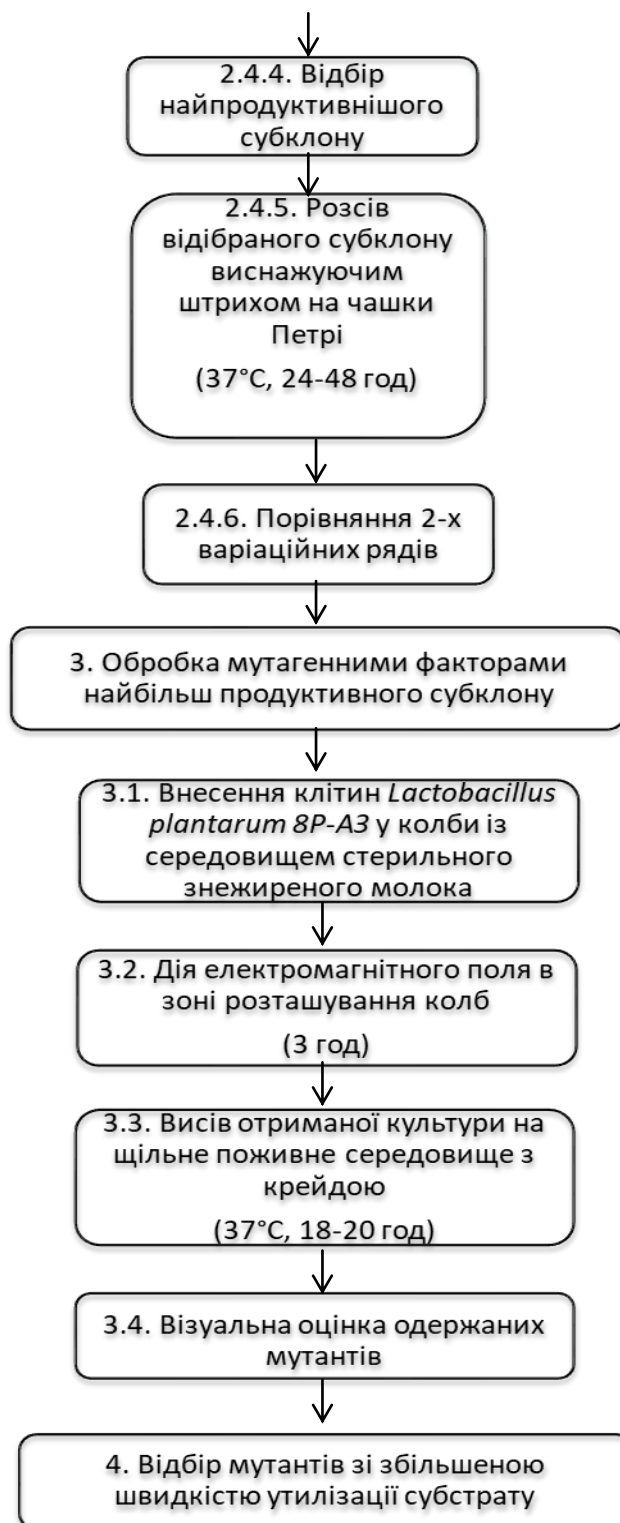


Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ПБ.БТ6206.ДП

Арк.

46



Отже, одержання високопродуктивного промислового продуценту обраним методом полягає в наступній послідовності маніпуляцій:

- 1) виділення вихідного організму з біотопів здорових людей;
- 2) підготовка штаму до селекційної роботи, що включає отримання накопичувальної культури *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 на рідкому

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

елективному середовищі, чистку та стабілізацію культури для відбору найбільш продуктивного субклубу;

3) обраний субклуб вносять у колби зі стерильним середовищем МРС-1 та розташовують у зоні дії низькочастотних електромагнітних полів впродовж трьох годин;

4) отримані мутанти перевіряють за швидкістю утилізації субстрату та життєздатністю клітин висівом на щільне поживне середовище з крейдою, проводячи підрахунок колоній, що вирости та порівнюючи зони просвітління навколо них. Показник антагоністичної активності визначають методом дифузії в агар відносно тест-культур роду *Enterobacter*, *Escherichia coli* і *Staphylococcus aureus*;

5) відбирають найбільш продуктивний мутант за усіма показниками.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: Лактобактерин.

Латинська назва продукції: *Lactobacterinum siccuum*.

Міжнародна непатентована назва продукції: Lactic acid producing organisms.

Діючим нормативно-технічним документом на продукцію є фармакопейна стаття ФС 42-3256-96. Термін дії реєстраційного посвідчення закінчився 19.05.2019, що свідчить про те, що підприємства-аналогу з виробництва пробіотичного препарату Лактобактерину в Україні станом на 2020 рік немає.

Призначення продукції та можливі галузі використання: препарат застосовують з лікувальною та профілактичною метою дорослим і дітям (з перших місяців життя) при порушеннях біоценозу кишечника різної етіології (в тому числі дисбіозів, що є результатом прийому антибіотиків, хіміотерапії тощо) та акушерсько-гінекологічних процедурах. Можливе використання Лактобактерину у формі дієтичної добавки до раціону харчування.

Зовнішній вигляд та основні фізико-хімічні властивості: препарат являє собою мікробну масу живих лактобактерій, ліофільно висушених; порошок (кристалічна або пориста маса) жовтувато-бежевого кольору з кисломолочним запахом та смаком. При додаванні води утворює гомогенну завись жовтувато-бежевого кольору [47].

Пакування: по 2 або 3, або 5 доз у скляні флакони типу ФО-1-10 або ФИ-05 зі скла марки НС-1А чи НС-1 за ТУ 9461-025-00480678-99, або у флакони типу ФЛП-10-А чи ФЛП-5-А зі скла марки УСП-1 за ТУ 00480945-006-98, або у флакони типу ФО-1-10 чи ФИ-1-5 зі скла марки НС-3 за ТУ

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив	Державцева Ю.І.					Д	49	131
Консульт.								
Керівник	Олійник Н.М.							
Затвер.								
						КПІ ім. Ігоря Сікорського		

9461-010-00480514—99 та обтиснуті алюмінієвими ковпачками типу К-2-20 чи К-2-14 за ТУ У 25206109.001—2001 або за ТУ У 28.7-30883300-005-2002, або за ТУ У 14257180.003-98. По 10 флаконів препарату та інструкцію з його використання вкладають у пачку за ОСТ 64-071-89 з картону коробкового за ГОСТ 7933-89 з перегородками або гофрованою вкладкою, або з полімерною вкладкою з плівки полівінілхлоридної для розміщення та фіксації флаконів.

На флакони наклеюють етикетку з етикеткового паперу за ГОСТ 7625-86 або з паперу для письма за ГОСТ 18510-87, або етикетку на липкій основі. Групова і транспортна тара відповідно до ГОСТ 17768-90.

Маркування: на флакон фарбою глибокого друку для скляних виробів за ТУ У 42.34.011—97 українською або російською мовою наносять: назву препарату, кількість доз, номер серії, термін придатності. На етикетці флакону українською та російською мовами вказують: виробника, товарний знак, назву препарату латинською, українською та російською мовами, кількість доз, номер серії, термін придатності. На пачці та етикетці групової тари українською та російською мовами наносять: «Україна», виробник, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською та російською мовами, лікарську форму, кількість доз, кількість флаконів, «Для застосування перорально», умови зберігання, «Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер у країні імпортерів (за потреби). Номер серії та термін придатності допускається наносити збоку пачки методом тиснення. На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок. Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192-96.

Транспортування: препарат транспортують у закритих транспортних засобах усіма видами критого транспорту за температури 2—8 °С відповідно до ГОСТ 7768-90 [1].

Зберігання: зберігають у сухому, захищеному від світла місці за температури від 2 до 8 °С.

Термін придатності: 2 роки [47].

					<i>ПБ.БТ6206.ДП</i>	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітки
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1. Амоній гідроксид	ТУ 6-09-01-755-89	Усі показники відповідно до вимог ТУ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.2. Гідрохлорид моногідрат L-цистеїн	Імпортний постачальник, Carl Roth GmbH + Co KG, Німеччина у відповідності до Регламенту (ЕС) № 1907/2006 (REACH)	Усі показники відповідно до вимог Регламенту (ЕС)	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.3. Глюкоза	ГОСТ 975-88	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.4. Дріжджі хлібопекарські пресовані	ДСТУ 4812:2007	Усі показники відповідно до вимог ДСТУ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу та виробничого культивування
1.5. Желатин харчовий	ГОСТ 11293-89	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент захисного середовища сушіння
1.6. Казеїн харчовий	ДСТУ 6031:2008	Усі показники відповідно до вимог ДСТУ	Компонент ПС для виробничого культивування
1.7. Калій фосфорнокислий двозаміщений 3-водний	ГОСТ 2493-75	Масова частка $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ не менше 98%	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу

1.8. Ліофілізована музейна культура <i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	ФС 42-3256-96	Специфічна активність (в 1 флаконі з ліофілізованою робочою культурою не менше 10^8 КУО/см ³), мікробіологічна чистота (відсутні сторонні бактерії, дріжджові і плісняві гриби)	Робоча культура для отримання посівного матеріалу
1.9. Марганець сірчаноокислий 5-водний	ГОСТ 435-77	Масова частка $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ не менше 96%	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.10. Магній сірчаноокислий 7-водний	ГОСТ 4523-77	Масова частка $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ не менше 99,5%	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.11. Молоко коров'яче пастеризоване, знежирене	ДСТУ 2661:2010	Усі показники відповідно до вимог ДСТУ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу; компонент захисного середовища сушіння
1.12. Натрій оцтовокислий 3-водний	ГОСТ 199-78	Масова частка $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ не менше 99%	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.13. Панкреатин для виробництва бактерійних препаратів	ТУ 49-619-79	Усі показники відповідно до вимог ТУ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу та виробничого культивування
1.14. Пептон сухий ферментативний	ГОСТ 13805-76	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.15. Печінка великої рогатої худоби	ГОСТ 193421- 73	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.16. Сахароза	ГОСТ 5833-75	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент захисного середовища сушіння

Продовження таблиці 4.1.

1.17. Твін-80	ТУ 6-14-938-79	Усі показники відповідно до вимог ТУ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу
1.18. Хлорид натрію	ГОСТ 4233-77	Масова частка NaCl не менше 99,9%	Компонент фізіологічного розчину для одержання культури І генерації
1.19. Хлороформ	ГОСТ 20015-88	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент ПС для отримання посівного матеріалу та виробничого культивування
2. Допоміжна сировина			
2.1. Аміак водний	ГОСТ 3760-79	Масова частка NH ₃ не менше 25%	Для регулювання рН під час приготування поживних середовищ, при виробничому культивуванні та на стадії стабілізації культуральної рідини
2.2. Вапно хлорне	ГОСТ 1692-85	Масова частка активного хлору не менше 28%	Для знешкодження матеріалів для прибирання
2.3. Вода питна	ДСанПіН 2.2.4-171-10	рН=6,5-8,5; загальна жорсткість ≤ 7,0 ммоль/дм ³ ; хлориди ≤ 250 мг/дм ³	Для підготовки миючих, дезінфікуючих та робочих розчинів; для отримання води очищеної; для приготування рідких компонентів поживних середовищ; холодоагент; для миття приміщення, обладнання і первинного пакування

Продовження таблиці 4.1.

2.4. Засіб миючий синтетичний порошкоподібний	ГОСТ 25644-96	Масова частка фосфорнокислих солей (в перерахунку на P_2O_5) не більше 22%	Для миття приміщення, обладнання і первинних пакувальних матеріалів
2.5. Кислота соляна технічна	ГОСТ 857-95	Масова частка хлористого водню не менше 31,5%	Для нейтралізації стічних вод
2.6. Натр їдкий технічний	ГОСТ 2263-79	Масова частка гідроксиду натрію не менше 42%	Для нейтралізації стічних вод
2.7. Перекис водню	ГОСТ 177-88	Масова частка H_2O_2 – 30-40%	Для дезінфекції приміщення та обладнання
2.8. Плівасепт 5% концентрат з ПАВ	Імпортний засіб, Пліва(Хорватія)	Масова частка хлоргексидину біглюконату – 5%	Для дезінфекції приміщення та обладнання
3. Матеріали			
3.1. Активоване вугілля порошкове	ДСТУ EN 12903:2004	Усі показники відповідно до вимог ДСТУ	Для підготовки води очищеної
3.2. Ковпачки алюмінієві до флаконів	ТУ У 25206109.001—2001	Цілісність	Для первинного пакування готового продукту
3.3. Коробки із картону	ГОСТ 12301-2006	Цілісність	Для вторинного пакування готового продукту
3.4. Матеріал фільтруючий ТЛФ-5	ГОСТ 26095-84	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Для фільтрування гідролізату знежиреного молока та панкреатичного гідролізату казеїну
3.5. Матеріал фільтруючий ТФХЛ	ГОСТ 332-91	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Для підготовки води очищеної

Продовження таблиці 4.1.

3.6. Матеріал фільтруючий ФПП-15-1,5 (тканина Петрянова)	ТУ 2568-074-05754293-2007	Усі показники відповідно до вимог ТУ	Для фільтрування технологічного повітря
3.7. Матеріал фільтруючий ФРНК	ТУ 8397-126-00322318-97	Усі показники відповідно до вимог ТУ	Для попередньої очистки повітря від механічних контамінантів
3.8. Пробки гумові для закупорювання флаконів	ТУ У 6-00152253.013-96	Цілісність	Для первинного пакування готового продукту
3.9. Флакони зі скла марки НС-3	ТУ 9461-010-00480514—99	Цілісність	Для первинного пакування готового продукту
4. Напівпродукти			
4.1 Напівфабрикат Лактобактерину (стабілізована культуральна рідина)	ФС 42-3256-96	Мікробіологічна чистота (відсутні сторонні бактерії, дріжджові і плісняві гриби), рН 6,0—6,5	Для розливу у флакони та подальшого сублімаційного сушіння

4.3. Опис технологічного процесу

Виробництво пробіотичних препаратів передбачає два основних блоки робіт: допоміжні роботи і власне технологічний процес.

До допоміжних робіт належать: санітарна підготовка виробництва, підготовка технологічного та вентиляційного повітря, води фармакопейної якості, сировини і матеріалів (приготування поживних і захисних середовищ, первинного пакування).

Основний технологічний процес виробництва пробіотичного препарату Лактобактерину охоплює підготовку посівного матеріалу (одержання культури І—ІІІ генерації), виробничий біосинтез, стабілізацію культуральної

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

рідини за рахунок її змішування із захисним середовищем (середовище сушіння), розлив напівфабрикату у флакони, одержання ліофілізованого напівфабрикату (заморожування і сублімаційне сушіння) та закупорювання флаконів із готовою продукцією [1]. Послідовність виробничого процесу проілюстрована на технологічній схемі та графічно відображена на апаратурній схемі виробництва Лактобактерину.

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва здійснюється відповідно до вимог GMP (Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика) і полягає у підготовці виробничого персоналу, виробничих приміщень, технологічного обладнання, приготування мийних, дезінфікуючих та робочих розчинів.

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Безпека готової продукції, процесів її виготовлення та зберігання вимагає проведення професійної гігієнічної підготовки всього виробничого персоналу, а також осіб, що мають доступ у виробничі та складські зони. На фармацевтичних підприємствах особи, що надходять на роботу, повинні пройти медичний огляд, професійну гігієнічну підготовку та атестацію. Первинна гігієнічна підготовка проводиться при прийомі на роботу, наступна – щонайменше один раз в 1-2 роки. Форма підготовки може бути очною (семінари, тренінги, інструктажі), очно-заочною або заочною (самопідготовка) за затвердженими керівником виробництва, або керівником відділу контролю якості методичними матеріалами. У більшості випадків пріоритет надають очному індивідуальному навчанню.

Крім основного навчання щодо теорії і практики системи управління якістю та GMP, кожен прийнятий на роботу співробітник повинен пройти навчання відповідно до закріплених за ним обов'язків. За результатами навчання проводиться контроль знань і навичок працівника у формі усної співбесіди або у вигляді тестового контролю.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						56
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Стандартом якісної роботи на фармацевтичних підприємствах вважається щоденний огляд відкритих поверхонь тіла працівників на наявність гнійничкових захворювань шкіри. Всі особи, що є носіями збудників інфекційних захворювань, якщо вони можуть сприяти забрудненню продукції при виконанні своїх виробничих завдань, за їх згодою тимчасово переводяться на іншу роботу, не пов'язану з ризиком поширення інфекції [48].

ДР 1.2 Підготовка миючих і дезінфікуючих розчинів

Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів необхідна для подальшого миття і деконтамінації виробничих приміщень, обладнання та комунікацій. Приміщення або місце приготування дезінфікуючих розчинів повинно бути забезпечено приточно-витяжною системою вентиляції.

ДР 1.2.1 Підготовка розчину перекису водню

Для отримання 6%-го перекису водню 33%-й розчин H_2O_2 за допомогою дозуючого пристрою вводять у невеликий апарат (реактор) з механічним перемішуючим пристроєм. В реактор подають воду питну і забезпечують перемішування розчину при 40 об/хв. Даний дезінфікуючий розчин використовують для обробки приміщень і корозійностійкого обладнання зі скла та полімерних матеріалів в поєднанні з розчином миючого засобу.

ДР 1.2.2 Підготовка розчину хлоргексидину біглюконату

Для приготування 0,1-0,2%-го дезінфікуючого засобу в реактор з водою питною подають за допомогою дозатору 5%-й розчин хлоргексидину біглюконату, що випускається під торговою назвою «Плівасепт» і перемішують зі швидкістю 40 об/хв. Розчин готують для разового використання. Отриманий 0,1-0,2%-й хлоргексидин біглюконат використовують з розрахунку 200 мл на 1 м² для дезінфекції приміщень і обладнання.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 1.2.3 Підготовка розчину миючого засобу

Приготування розчину синтетичного миючого засобу проводять в реакторі при перемішуванні 40 об/хв і нагріванні до 40-50 °С з розрахунку: 50 мл миючого засобу на 10 л питної води. Отриманий миючий розчин використовується для обробки виробничих приміщень та мийки вузлів обладнання [49].

ДР 1.3 Підготовка робочих розчинів

Попереднього приготування для виробництва Лактобактерину потребують наступні розчини: фізіологічний розчин, розчин аміаку, розчини глюкози та желатози.

ДР 1.3.1 Приготування фізіологічного розчину

Для отримання фізіологічного розчину 0,9 г NaCl розчиняють у 100 мл питної води. Розчин підлягає термічній стерилізації у автоклаві за температури 132 °С і тиску 0,1 МПа протягом 30 хв. Готовий фізіологічний розчин використовують для одержання культури І генерації з ліофілізованої музейної культури *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 [38].

ДР 1.3.2 Приготування розчину аміаку

Розчин аміаку концентрацією 5% отримують у реакторі внаслідок розбавлення 10% аміачної води необхідною кількістю води питної при перемішуванні 40 об/хв. Готовий розчин використовують для регулювання рН під час приготування поживних середовищ та середовища сушіння, при виробничому культивуванні та на стадії стабілізації культуральної рідини.

ДР 1.3.3 Приготування стерильного розчину глюкози

Приготування розчину глюкози відбувається у реакторі з мішалкою та барботажним пристроєм для введення пари. У реактор з водою питною за допомогою дозатора подають глюкозу та вмикають перемішуючий пристрій. Для остаточного розчинення глюкози проводять попереднє нагрівання гомогенату гострою парою до 70-80 °С. Отриманий розчин глюкози піддають термічній стерилізації насиченою водяною парою за температури 120 °С і тиску 0,1 МПа протягом 30 хв. Розчин глюкози є легкозасвоюваним

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						58
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

джерелом вуглецю для *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, тому його вводять під час глибинного культивування виробничої культури у ферментер до кінцевої концентрації у середовищі 1,5-1,7 %.

ДР 1.3.4 Приготування розчину желатози

Щоб отримати розчин желатози, в реактор до сухого желатину додають питну воду з розрахунку 1 л води на 90—100 г желатину. Розчин ретельно перемішують за допомогою механічного перемішуючого пристрою зі швидкістю 120 об/хв і залишають для набухання за кімнатної температури на 3 год.

ДР 1.3.5 Стерилізація розчину желатози

Розчин желатози стерилізують термічним способом в реакторі, куди подають насичену водяну пару за температури 121 °С та тиску 0,1 МПа протягом 25 хв. Простерилізований розчин необхідний для додавання до рідкого напівфабрикату Лактобактерину у якості кріопротектора [1].

ДР 1.4 Підготовка виробничих приміщень

Підготовка приміщень для виробничого процесу полягає в щоденному та генеральному прибиранні. Всі роботи з миття та дезінфекції приміщення проводять в окулярах, гумових рукавичках і гумовому фартусі.

Генеральне прибирання відбувається 1 раз на тиждень. При цьому приміщення обробляють теплим розчином синтетичного миючого засобу, що має температуру від 40 до 50 °С, потім дезінфікуючим розчином 0,1-0,2%-го хлоргексидину біглюконату. Прибирання проводять наступним чином:

- стіни обприскують дезінфікуючим розчином з пульверизатора з розрахунку 150-200 мл/м²;
- підлогу миють спочатку розчином миючого засобу з подальшою обробкою дезінфікуючим розчином.
- вікна, двері, поверхню обладнання протирають ганчіркою, змоченою в дезінфікуючому розчині.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

• ваги, корозійні частини обладнання, які будуть задіяні у виробничому процесі, електроосвітлювальну апаратуру протирають ганчіркою або серветкою, змоченою дезінфікуючим розчином.

Після обробки приміщення включають стельові бактерицидні лампи на 1 годину.

Щоденна обробка приміщень проводиться перед початком виробничого процесу і здійснюється наступним чином:

- пил з поверхні столів, стін, вікон, обладнання та інвентарю протирають ганчіркою або серветкою, змоченими дезінфікуючим розчином хлоргексидину біглюконату;
- підлогу миють спочатку синтетичним миючим засобом, після цього обробляють дезінфікуючим розчином 1 раз за зміну (2 рази на день). Для очищення повітря від мікроорганізмів в обідню перерву в приміщеннях включають бактерицидні лампи на 30 хв.

Після одноразового використання, матеріали для прибирання (ганчірки тощо) знешкоджують замочуванням в 5% освітленому розчині хлорного вапна не менше ніж протягом 2-3 годин, потім матеріали споліскують у воді питній, сушать на повітрі і використовують повторно. Відпрацьовані розчини і промивні води після прибирання направляють на знешкодження відходів [50].

ДР 1.5 Підготовка обладнання та комунікацій

Приступаючи до роботи проводять наступну перевірку обладнання:

- Відсутність в ємностях продукту від попереднього виробничого циклу;
- Справність запірної арматури, щільність фланцевих з'єднань і сальникових ущільнень;
- Заземлення апаратури і комунікацій;
- Справність контрольно-вимірювальних приладів.

Перед початком кожного нового виробничого циклу миють ємності, змінюють фільтрувальні матеріали. На місткостях зазначають, який препарат або напівпродукт в них знаходиться і вказують його фізико-хімічні дані.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Періодичне очищення і дезінфекція обладнання повинні проводитися відповідно до графіка шляхом обробки 6%-м розчином перексиду водню з додаванням 0,5% розчину миючого засобу з наступним промиванням теплою і холодною водою. Визначення мікробного забруднення обладнання та комунікацій повинно проводитися за допомогою змивів стерильними тампонами не рідше 1 разу на 2 тижні під час виробничого процесу. У змивах із зовнішніх поверхонь обладнання та комунікацій допускається наявність не більше 10 неспороутворюючих мікроорганізмів [51].

ДР 2 Підготовка повітря

Підготовку повітря для виробництва пробіотичного препарату Лактобактерину розділяють на: 1) підготовку стерильного вентиляційного повітря чистих приміщень – зон класу А та приміщень класу В, С, D, 2) підготовку технологічного стерильного повітря для сушіння напівфабрикату і закупорювання флаконів.

ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря для чистих приміщень

Повітря у чистих приміщеннях виконує ряд специфічних функцій:

- створює (розгалужує) зони з різною чистотою повітря;
- забезпечує необхідні комфортні умови праці персоналу;
- потік повітря витискає забруднення з чистої зони.

Належна виробнича практика орієнтована на те, що для підтримки належного ступеня чистоти вентиляційне повітря повинне проходити очищення з використанням фільтрів відповідної ефективності.

ДР 2.1.1 Забір повітря з атмосфери

Процес підготовки повітря розпочинається із збирання повітря з атмосфери. Це відбувається за допомогою трубчастих конструкцій висотою 8-10 м. Труба розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю. Повітря з атмосфери з температурою, як правило, 18-20°C та

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

вологістю 60-70% поступає до повітрозабірника, де попередньо очищується від великих механічних часток за допомогою решітки.

ДР 2.1.2 Попередня очистка повітря від механічних контамінантів

Повітря потрапляє у фільтри попередньої очистки, де звільняється від грубого аерозолі – пилу. Фільтри такого типу встановлюють на всмоктуючій лінії перед вентилятором. Шляхом інерційного осадження очищають повітря від великих часток розміром більше 5 мкм. Для досягнення необхідного ступеня очистки повітря необхідна періодична регенерація фільтруючої поверхні, тому доцільним є вибір фільтра періодичної дії [10]. До фільтрів періодичної дії відносяться касетні регенеруючі масляні фільтри і касетні фільтри сухого типу. Широке застосування для очистки повітря від механічних часток отримали коміркові фільтри з гофрованих промаслених сіток конструкції Рекка (ФЯР). Тривалість його експлуатації без регенерації залежить від ступеня забрудненості повітря. Якщо вміст пилу зростає більше 5,0 мг/м³, то тривалість роботи фільтра скорочується.

ДР 2.1.3 Стиснення повітря

Компресування повітря необхідне для того, щоб забезпечити належний об'єм подачі і відповідний до технологічних вимог тиск повітря. Нагнітання повітря здійснюється за допомогою вентиляторів (низького або середнього тиску). Стискання повітря до тиску 0,3 МПа призводить до того, що повітря може розігріватися більше ніж до 100 - 120 °С. Такий тиск потрібний для подолання гідродинамічного опору в системі транспортування повітря.

ДР 2.1.4 Відділення сконденсованої вологи та охолодження повітря

Надмірна вологість призводить до конденсації парів води і змочування частинок фільтрувального матеріалу. Це особливо неприпустиме при використанні волокнистих фільтрувальних матеріалів. Тому метою даної стадії є забезпечення потрібного рівня вологості та температури повітря. Система регуляції та стабілізації термодинамічних показників реалізується в уніфікованому устаткуванні і забезпечує оптимальну температуру (18-20 °С)

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

та вологість повітря (60%) для комфортного перебування працівників у приміщенні. Всі ці функції реалізують у кондиціонері [52].

ДР 2.1.5 Очистка повітря на повітряному фільтрі

Головні повітряні фільтри призначені для уловлювання основної маси забруднень (98% контамінантів), що потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки і вентилятора, а також для подовження терміну служби фільтрів стерилізуючих типу HEPA, що виконують основний процес стерилізації на стадії фільтрації.

Типовими є вертикальні апарати з решіткою у днища. На решітку укладають шар скловати, а потім шар гранульованого активного вугілля висотою 0,8-1,0 см і ще шар вати. В якості фільтруючого матеріалу використовують скловолокно. Очищене повітря, отримане на даній стадії, характеризується розміром часток не більше 1,5-3 мкм. Вентиляційне повітря, яке пройшло двоступеневу очистку, призначене для використання у чистих приміщеннях С і D класів чистоти.

ДР 2.1.6 Термінальна стерилізуюча фільтрація повітря на фільтрі типу HEPA

HEPA фільтр є ключовою ланкою системи, від якої залежить ефективність роботи всієї повітроочисної станції. Високоєфективні HEPA фільтри містять волокна діаметром 0,3 - 6,5 мкм, відстань між якими складає від 10 до 40 мкм. Такі фільтри, як правило, складаються з рамки, що виготовляється з картону або оцинкованої сталі, усередині якої укладений фільтруючий матеріал у вигляді гофрів, що спирається з боку виходу повітря на сітку гофрованої (хвилеподібної) форми. Установка фільтрів HEPA безпосередньо в стелі чистих приміщень спрямована звести до мінімуму або взагалі виключити можливість накопичення пилу на яких-небудь поверхнях по ходу повітря від фільтра до чистого приміщення. Ефективність такого фільтру по затримці частинок розміром 0,3 мкм становить 99,999%. Повітря, що пройшло крізь фільтр типу HEPA є вільним від мікроорганізмів розміром

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

більше 0,3 мкм і призначене для постачання у чисту зону класу А та приміщень класу В.

Контроль мікробного забруднення повітря виробничих приміщень слід проводити за допомогою "Приладу для бактеріологічного аналізу повітря" системи Кротова не рідше 1 разу на 2 тижні за 1 - 1,5 години до початку роботи. Чистота повітря повинна відповідати встановленим нормам. Наявність в повітрі виробничих приміщень спорових мікроорганізмів не допускається.

ДР 2.1.7 Рециркуляція відпрацьованого повітря

Системи підготовки повітря для чистих приміщень (системи вентиляції і кондиціонування) проектується з використанням рециркуляції повітря, тобто повітря, що надходить у приміщення являє собою зовнішнє повітря, що пройшло необхідну підготовку, і рециркулююче повітря, яке узятє з чистого приміщення і яке пройшло вторинне очищення. Використання рециркуляції дозволяє суттєво знизити витрати на багатоступеневу очистку атмосферного повітря [53].

ДР 2.2 Підготовка технологічного повітря

ДР 2.2.1 Забір повітря з атмосфери

Повітря з атмосфери з температурою, як правило, 18-20°C та вологістю 60-70% поступає до повітрязабірника, де воно попередньо очищується від великих механічних часток за допомогою решітки аналогічно до стадії ДР 2.1.1.

ДР 2.2.2 Попередня очистка повітря від механічних контамінантів

Таке очищення відбувається в фільтрі попередньої очистки періодичної дії та дозволяє позбутися пилу (до 5мг/м³), крапель вологи та частково мікроорганізмів, що мають розмір більше 5 мкм. Очищення відбувається за допомогою фільтра коміркового типу Рекка, що заповнений 12 металічними гофрованими сітками, які змащені маслом.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2.2.3 Стиснення повітря

Турбокомпресор здійснює адіабатне стиснення повітря до 0,5 МПа, внаслідок чого повітря може розігріватися до температури більше ніж 200 °С. Як і в ДР 2.1.3 стиснення повітря необхідне для того, щоб забезпечити належний об'єм подачі і відповідний до технологічних вимог тиск повітря.

ДР 2.2.4 Охолодження повітря

Щоб уникнути попадання вологи в фільтри, повітря охолоджують до температури нижче точки роси (в даному випадку 27-28°C) для відділення вологи (W=60%). Це здійснюється за допомогою кожухотрубного теплообмінника. Для охолодження повітря в міжтрубний простір теплообмінника подають питну воду.

ДР 2.2.5 Відділення сконденсованої вологи

Охолоджене повітря з теплообмінника надходить в ресивер, призначений для вирівнювання тиску у системі та видалення крапельної вологи. Всередині ресивера змонтовані відбійні пластини, під час контакту з якими повітря змінює напрям руху і утворюється крапельна волога. Температура в апараті підіймається до 36-40°C і контролюється за допомогою термометра. Також встановлений датчик тиску, оскільки далі повітря передається до безпосередньої очистки.

ДР 2.2.6 Очистка повітря на головному фільтрі

Фільтр грубої очистки призначений для уловлювання основної маси забруднень, що потрапила в систему після проходження фільтрів попереднього очищення і компресора, а також для подовження терміну служби фільтрів тонкого очищення, що виконують основний процес стерилізації на стадії фільтрації. Конструкція фільтра аналогічна тій, яка задіяна на стадії ДР 2.1.5. Діаметр часток, які уловлюються даним фільтром становить 1-1,5 мкм.

ДР 2.2.7 Термінальна стерилізуюча фільтрація повітря

Після головного фільтру повітря надходить на кінцевий етап очищення – на стерилізацію в фільтр тонкої очистки. Конструктивно такий фільтр дуже

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

схожий на фільтри грубої очистки, тільки значно менший за розмірами і в ньому використовуються більш ефективні фільтруючі матеріали, оскільки ефективність очищення повітря повинна досягати 99,99%. Вони набиваються особливою стійкою гідрофобною тканиною Петрянова, яка представляє собою надтонкі, хаотично сплетені в виді полотен на марлевій або іншій поруватій основі волокна товщиною 1,5 і 2,5 мкм з перхлорвінілу (ФПП-15 і ФПП-25), ацетатцелюлози (ФПА-15), полістиролу (ФПС-15), поліфторстиролу (ФПФС) [52].

Коефіцієнт проскоку в цих фільтруючих матеріалах складає не більш 0,001%. Контроль мікробіологічної чистоти повітря відбувається в пробовідбірнику за допомогою найбільш стійкого еталонного мікроорганізму *Bacillus stearothermophilus*.

ДР 3 Підготовка води очищеної

У відповідності з узагальненою схемою для проведення виробничого процесу отримання Лактобактерину потрібна попередня підготовка води, яка включає: видалення механічних та колоїдних часток, солей жорсткості, вільного хлору тощо. Для отримання води очищеної використовують установку фірми Rochem, яка складається з: відцентрового насоса, що призначений для подання води у фільтраційну установку; вугільного фільтра; волокнистого фільтра; насоса високого тиску, призначеного для створення тиску 4 – 6МПа, необхідного для фільтрації у ДТ-модулях; фільтрів зворотньоосмотичних (ДТ-модулі), призначених для дистиляції води водопровідної.

ДР 3.1 Попередня фільтрація води від механічних часток

Груба фільтрація дозволяє видаляти з води питної частки розміром більше 80 мкм. В якості устаткування для грубої фільтрації використовуються фільтри з піщаним завантаженням. До такого типу відносяться фільтри механічного очищення з гранульованим завантаженням періодичної дії. Вибір сорту завантаження (піску, гравію тощо) залежить від результатів аналізу води з урахуванням сезонних змін. Фільтр періодично

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

промивається. Справність фільтру контролюється різницею тиску води до і після фільтру. Перші об'єми відфільтрованої води, що містять деяку кількість забруднень, скидають в каналізацію, відбувається так зване «санітарне промивання».

ДР 3.2 Фільтрація води через вугільний фільтр

Фільтрація через вугільний фільтр дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору шляхом їх адсорбції на активованому вугіллі. Використовуються стандартні патронні фільтри з активованим вугіллям. Справність фільтру контролюється різницею тиску води до і після фільтру. Дана стадія призначена для очищення питної водопровідної води від механічних домішок розміром 5-10 мкм.

ДР 3.3 Фільтрація води через волокнистий фільтр

Перед подачею на зворотньоосмотичні модулі вода проходить очищення на патронному фільтрі тонкої очистки, що запобігає потраплянню сторонніх часток, розміром більше 3 мкм на мембрану.

ДР 3.4 Мембранна очистка води у зворотньоосмотичних модулях

На стадії мембранної очистки вода звільняється від органічних сполук і солей. Видалення домішок відбувається за рахунок пропускання води через напівпроникну мембрану при тиску, що перевищує осмотичний. Для збільшення ефективності процесу використовується тангенціальна подача води до поверхні мембрани при рециркуляції. Мембрани мають розміри пор 0,0005 - 0,001 мкм. Зворотньоосмотичний модуль для отримання води очищеної являє собою блок фільтраційних елементів фланцевого типу з поліпропіленових волокон. На зворотньоосмотичний фільтр (ДТ-модуль) потрапляє вода під тиском 4-6 МПа, який створюється за допомогою насосу високого тиску. Вихідна вода при цьому тиску продавлюється крізь напівпроникні мембрани, які знаходяться у фільтраційних модулях ДТ-модулях. При цьому відбувається розділення води на два потоки: воду фільтрат та концентрат.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Контроль систем зворотного осмосу здійснюється виміром питомої електричної провідності води на виході з системи. Критерій питомої електропровідності води очищеної складає 4,3 мкСМ/см при температурі 20°C.

ДР 3.5 Зберігання води очищеної

Вода після проходження фільтрації надходить в ємкість – накопичувач води очищеної, що має датчик регулювання рівня води. Датчики підключені до мікропроцесора установки і при заповненні ємкості відключають установку зворотного осмосу чи включають її по мірі використання очищеної води [53].

ДР 4 Підготовка та стерилізація поживних середовищ

Технологією виробництва Лактобактерину передбачено приготування трьох поживних середовищ: поживного середовища МРС-1 для отримання посівного матеріалу, казеїново-дріжджового поживного середовища для виробничого культивування та захисного сахарозо-молочного середовища сушіння.

ДР 4.1 Підготовка стерильного поживного середовища МРС-1 для отримання посівного матеріалу

Одержання посівного матеріалу здійснюють на рідкому середовищі МРС-1 наступного складу (г/дм³): $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; цистеїн — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; амоній лимоннокислий — 2,0; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 5,0; пептон сухий ферментативний — 10,0; глюкоза — 20,0; рідкі компоненти, см³/дм³: печінковий екстракт — 100,0; дріжджовий автолізат (вміст амінного азоту 0,15 %) — 50,0; гідролізат знежиреного молока — 330,0; твін-80 — 1,0; вода очищена — до 1,0 дм³ [1].

ДР 4.1.1 Приготування печінкового екстракту

Приготування печінкового екстракту відбувається у реакторі з мішалкою та барботажним пристроєм для введення пари. У реактор з водою питною за допомогою дозатора подають подрібнену телячу печінку та вмикають перемішуючий пристрій. Перемішування проводять протягом

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						68
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

години зі швидкістю 120 об/хв і при нагріванні екстракту насиченою водяною парою до температури 90 °С.

ДР 4.1.2 Приготування дріжджового автолізу

Проводять автоліз хлібопекарських дріжджів за температури 56-58°C протягом 48 годин. Далі до дріжджів додають воду питну та перемішують до гомогенної суспензії зі швидкістю 120 об/хв протягом 30 хв. В готовому автолізаті контролюють вміст амінного азоту (150-180мг%).

ДР 4.1.3 Приготування гідролізату знежиреного молока

В реактор до прокип'яченого знежиреного молока з рН $7,7 \pm 0,1$ додають панкреатин, попередньо розчинений у теплій воді, і хлороформ, витримують за температури 40 ± 2 °С протягом 72 год.

ДР 4.1.4 Фільтрація гідролізату знежиреного молока

Гідролізат знежиреного молока відцентровим насосом подається на поліпропіленовий рукавний фільтр. На даній операції контролюється тиск, що має відповідати 0,2 МПа [9].

ДР 4.1.5 Приготування розчину компонентів поживного середовища

У реактор з механічним перемішуючим пристроєм пропелерного типу подають воду очищену та включають перемішуючий пристрій. Через дозуючі пристрої завантажують сольові компоненти, цистеїн, пептон, твін-80, глюкозу, попередньо підготовлені рідкі компоненти: печінковий екстракт, дріжджовий автолізат та гідролізоване молоко, нагрівають гострою парою до 70°C для остаточного розчинення і суспендування. Швидкість обертів мішалки повинна бути в межах 120об/хв, час гомогенізації – 10-15 хвилин.

ДР 4.1.6 Нагрівання поживного середовища МРС-1

Гомогенат поживного середовища підлягає стерилізації у тому ж реакторі, де відбувалося його приготування. Спочатку поживне середовище МРС-1 нагрівається за рахунок подачі насиченої водяної пари до температури 121 °С протягом 10 хв.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 4.1.7 Витримування поживного середовища МРС-1

Нагріте до температури 121 °С поживне середовище витримується в посівному апараті за даної температури протягом 30 хв.

ДР 4.1.8 Охолодження поживного середовища МРС-1

Отримане стерильне поживне середовище МРС-1 охолоджують протягом 25 хв подачею холодної водопровідної води в сорочку реактору до температури, оптимальної для отримання маточної культури *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (37 °С) [54].

ДР 4.2 Підготовка стерильного казеїново-дріжджового поживного середовища для виробничого культивування

Виробничий біосинтез проводять на казеїно-дріжджовому середовищі (КД) наступного складу (г/дм³): дріжджовий автолізат — 25,0; панкреатичний гідролізат казеїну — 21,0; вода очищена — до 1,0 дм³ [1].

ДР 4.2.1 Приготування панкреатичного гідролізату казеїну

В реакторі готують розчин казеїну у воді питній, встановлюють необхідне значення рН – 8,0-8,2 за допомогою 5% розчину аміаку, додають хлороформ і панкреатин, витримують п'ять діб за температури 58-62 °С. Протягом даного періоду рН підтримують на зазначеному рівні. Починаючи з 4 доби, проводять визначення вмісту амінного азоту. Припинення збільшення даного показника свідчить про закінчення процесу гідролізу казеїну. Вміст амінного азоту в гідролізаті казеїну має знаходитися в межах 450-600 мг% [9].

ДР 4.2.2 Фільтрація панкреатичного гідролізату казеїну

Панкреатичний гідролізат казеїну відцентровим насосом подається на поліпропіленовий рукавний фільтр. На даній операції контролюється тиск, що має відповідати 0,2 МПа.

ДР 4.2.3 Приготування розчину компонентів казеїново-дріжджового поживного середовища у виробничому ферментері

У виробничий ферментер подають воду очищену та включають перемішуючий пристрій. Через дозуючі пристрої завантажують дріжджовий

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

автолізат, попередньо приготовлений на стадії ДР 4.1.2, та гідролізат казеїну, нагрівають гострою парою до 70°C для остаточного розчинення і суспендування. Швидкість обертів мішалки повинна бути в межах 120 об/хв, час гомогенізації – 10-15 хвилин. рН середовища регулюють 5% розчином аміаку на рівні $6,4 \pm 0,2$. Вміст амінного азоту в готовому середовищі має становити 150 мг%.

ДР 4.2.4 Нагрівання казеїново-дріжджового поживного середовища
Гомогенат поживного середовища у виробничому ферментері проходить стадію стерилізації. Спочатку поживне казеїново-дріжджове середовище нагрівається за рахунок подачі насиченої водяної пари до температури 121 °C протягом 10 хв.

ДР 4.2.5 Витримування казеїново-дріжджового поживного середовища

Нагріте до температури 121 °C поживне середовище витримується у виробничому ферментері за даної температури протягом 30 хв.

ДР 4.2.6 Охолодження казеїново-дріжджового поживного середовища

Отримане стерильне казеїново-дріжджове поживне середовище охолоджують протягом 25 хв подачею холодної водопровідної води в сорочку ферментеру до температури, оптимальної для культивування *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (37 °C) [54].

ДР4.3 Підготовка стерильного захисного сахарозо-молочного середовища

ДР 4.3.1 Фільтрація знежиреного молока від механічних вкраплень

Знежирене молоко фільтрують від механічних часток розміром більше 10 мкм на рукавних фільтрах із спіненого поліпропілену.

ДР 4.3.2 Стерилізація знежиреного молока

рН відфільтрованого знежиреного молока доводять до значення 7,4—7,6 5% розчином аміаку. Стерилізацію знежиреного молока проводять в реакторі за допомогою насиченої водяної пари за температури 121°C

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						71
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

впродовж 45 хв. Далі проводять охолодження до 35—40 °С за рахунок подачі води питної в сорочку реактора [1].

ДР 4.3.3 Приготування композиції сахарозо-молочного середовища

Для отримання сахарозо-молочного середовища в реактор-змішувач за допомогою дозуючих пристроїв подають отримане на попередній стадії знежирене молоко та додають сахарозу до кінцевої концентрації 30-32 %. Швидкість обертів мішалки повинна бути в межах 120 об/хв, час гомогенізації – 10-15 хвилин.

ДР 4.3.4 Нагрівання сахарозо-молочного середовища до температури стерилізації

Гомогенат поживного середовища стерилізують термічним способом у тому ж реакторі, в якому відбувалося приготування композиції сахарозо-молочного середовища. Спочатку його нагрівають за рахунок подачі насиченої водяної пари до температури 121 °С протягом 10 хв.

ДР 4.3.5 Витримування сахарозо-молочного середовища

Після досягнення температури 121 °С середовище витримують в реакторі 45 хв за даної температури.

ДР 4.3.6 Охолодження сахарозо-молочного середовища

Отримане захисне середовище охолоджують протягом 25 хв подачею холодної водопровідної води в сорочку реактору до температури 35-40°С [54].

ДР 5 Підготовка первинного пакування (флакони, гумових пробок та алюмінієвих ковпачків)

Первинне пакування перед заповненням пробіотичним препаратом Лактобактерином необхідно підготувати, а саме обов'язково очистити флакони, гумові пробки та алюмінієві ковпачки від заводських і транспортних забруднень, при цьому підготовлена первинна тара, що надходить на фасування готового препарату, повинна відповідати певному ступеню чистоти. Крім того, флакони повинні мати на внутрішній поверхні обмежену залишкову вологість, оскільки вода неконтрольовано змінює склад

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

лікарського препарату. За нормами фармацевтичного виробництва граничний вміст залишкової вологи повинен бути не більше 5% від обсягу флакона.

ДР 5.1 Миття первинних пакувальних матеріалів

Очищення від важкорозчинних забруднень полягає в промиванні внутрішньої і зовнішньої поверхонь флакона, орієнтованого горлом вниз, гумових пробок та алюмінієвих ковпачків струменями миючого засобу з питною водою, нагрітою до температури 50-60°C, впродовж 1 хв.

ДР 5.2 Ополіскування первинних пакувальних матеріалів

За нормами фармацевтичного виробництва кожний флакон, орієнтований горлом вниз, підлягає проведенню шприцевого ополіскування під тиском не менше 10 секунд очищеною водою за температури 50-60°C. Також споліскують пробки та алюмінієві ковпачки.

ДР 5.3 Попереднє нагрівання первинних пакувальних матеріалів

Видалення залишкової вологи з первинних пакувальних матеріалів відбувається шляхом сушки в сушарці-стерилізаторі тунельного типу. Для цього первинну тару попередньо нагрівають повітряним потоком зі швидкістю 0,45 м/с±20 % до температури 100°C впродовж 15 хв.

ДР 5.4 Стерилізація первинних пакувальних матеріалів

Високотемпературну стерилізацію проводять в потоці стерильного повітря, швидкість якого досягає до 0,6 м/с±20%. Первинні пакувальні матеріали стерилізують в сушарці-стерилізаторі тунельного типу за температури 200°C протягом 1 год.

ДР 5.5 Охолодження первинних пакувальних матеріалів

Для охолодження первинних пакувальних матеріалів сушарка-стерилізатор оснащена поверхневим повітроохолоджувачем. Циркуляція повітря в зоні охолодження є внутрішньою, завдяки чому, немає необхідності збирати великий обсяг повітря з чистого приміщення і відводити вологе повітря. Тим самим скорочується обсяг повітря, що поступає в чисте приміщення завдяки чому знижуються витрати на очистку повітря.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Охолодження первинної тари здійснюють до кімнатної температури близько 18°C [55].

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

Інокулят одержують у результаті трьох послідовних пересівів (культура I, II і III генерації) робочої культури *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 на рідкому поживному середовищі МРС-1.

ТП 6.1 Одержання культури I генерації

Для отримання культури I генерації використовують флакони з ліофілізованою робочою культурою *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (10^8 — 10^9 КУО/см³), у які вносять фізіологічний розчин хлориду натрію (1 см³ на дозу), ретельно перемішуючи. Розчинений вміст флакону пересівають на дві пробірки, що містять 5-7 мл поживного середовища МРС-1. Посіви інкубують в термостаті за температури (37±1) °C упродовж 24 год. Мікробіологічний контроль культури I генерації здійснюють мікроскопіюванням, а також висівом на МПА з 5 % глюкози і агаризоване середовище Сабуро (для виявлення сторонньої бактеріальної і грибною мікрофлори відповідно). Посіви на МПА витримують у термостаті за температури (38±1) °C упродовж 48 год, на середовищі Сабуро — за (22±1) °C протягом 72 год. Якщо сторонньої мікрофлори немає, то культуру I генерації використовують як посівний матеріал для одержання культури II генерації [1].

ТП 6.2 Одержання культури II генерації

Вирощену культуру *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 із пробірок пересівають в колби, що містять 500-550 мл поживного середовища МРС-1. Посіви II генерації інкубують при температурі (37±1) °C за періодичного перемішування протягом 24-48 годин. Через 40 год здійснюють мікробіологічний контроль як описано вище. Далі, переконавшись в чистоті культури, її використовують у якості посівного матеріалу для одержання культури III генерації.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						74
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП 6.3 Одержання культури III генерації

На даній стадії проводять пересів лактобактерій з колб у посівний апарат місткістю 100 л, що містить 40-50 л поживного середовища МРС-1. Посіви III генерації інкубують при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ за періодичного перемішування протягом 24 годин [9]. Через 24 год здійснюють мікробіологічний контроль, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха на агаризованому середовищі МРС (має бути не нижче ніж 10^9 КУО/см³). По закінченню перевірки чистоти маточну культуру використовують для виробничого культивування і отримання рідкого напівфабрикату Лактобактерину [1].

ТП 7 Виробниче культивування

Вирощування виробничої культури здійснюють методом глибинного культивування у ферментері, який має бути оснащений паровою рубашкою для проведення стерилізації казеїново-дріжджового поживного середовища. Біореактор обладнаний пристроями для вимірювання та регулювання температури і рН середовища. Крім цього, він обов'язково повинен бути забезпечений спеціальними опціями для подачі поживного середовища і вуглеводів, введення інокуляту, подачі розчину аміаку і пробовідбірника. Виробниче культивування здійснюється у ферментері, що виготовлений з високоякісної сталі 316 L та обсяг якого становить 400 літрів. Для перемішування культивованої біомаси реактор обов'язково забезпечений механічною мішалкою зі швидкістю обертання 200 об/хв. Ретельне перемішування культури необхідне для рівномірного розподілення поживних речовин серед клітин і для запобігання накопичення токсичних продуктів метаболізму в певному одному відсіку реактора. Крім того, ферментер повинен мати функціональну можливість проводити розлив препарату у флакони для проведення подальшої ліофілізації.

В асептичних умовах в біореактор, що містить 225 л казеїново-дріжджового середовища, вносять 45 л мікробної суспензії *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (20 % від обсягу поживного середовища) [9]. Вирощування

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

біомаси лактобактерій проводять за таких параметрів культивування: температура $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$; pH 6,8—7,0 (регулюють 5%-м розчином аміаку); надлишковий тиск 0,03—0,04 МПа; тривалість 8—10 год. Упродовж процесу біосинтезу періодично (щогодини на 10 хв) вмикають перемішувальний пристрій (200 об/хв), а також двічі (як правило, через 2 і 5—6 год культивування) у ферментер подають стерильний розчин глюкози до кінцевої концентрації у середовищі 1,5—1,7 %. Через кожні 2 год культивування з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації живих клітин. Стабілізація величини pH вказує на припинення росту культури. Процес культивування зупиняють після досягнення концентрації лактобактерій на рівні 10^9 КУО/см³ [1].

ТП 8 Стабілізація культуральної рідини

До культуральної рідини, одержаної на попередній стадії, додають стерильні кріопротектори: захисне сахарозо-молочне середовище та розчин желатози (гідролізований розчин желатину) і встановлюють pH 6,0—6,5 5%-м розчином аміаку, одержуючи напівфабрикат Лактобактерину. Вміст реактора перемішують і обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль напівфабрикату на відсутність сторонньої мікрофлори. В контрольній пробі після додавання захисного середовища також визначають: кількість живих лактобактерій (в одній дозі препарату має міститися не менше 10^9 живих бактерій) та активність кислотоутворення (одна доза препарату повинна утворювати кислоту не нижче 200 °Т) [9].

ТП 9 Розлив напівфабрикату Лактобактерину у флакони

Операції з наповнення флаконів напівфабрикатом Лактобактерину здійснюють на розливній машині KGS. Машину для розливу KGS лінійного типу оснащено V-подібними фіксаторами для орієнтації флаконів, тому розлив Лактобактерину відбувається синхронно під час руху флаконів. Спосіб заповнення флаконів шприцевий. Машина KGS забезпечує пряме регулювання дози препарату на панелі керування, а рецептури дозування препаратів зберігаються у пам'яті мікропроцесора і можуть

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						76
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

використовуватися повторно. Напівфабрикат Лактобактерину розливають по 9 мл у флакони, вибірково контролюючи його на наявність сторонньої мікрофлори. Флакони частково закривають гумовими пробками і передають на наступну стадію [1].

ТП 10 Сушіння напівфабрикату Лактобактерину

Стадія ліофільного сушіння дозволяє одержати стабільний сухий препарат пробіотика, легко відновлюваний при додаванні води. Даний етап складається з двох стадій: заморожування і сублімаційного сушіння. Процес ліофілізації відбувається в асептичних умовах під контролем мікробіологічної чистоти, вмісту життєздатних клітин, рівня адгезивних властивостей мікроорганізмів та якості сухої біомаси на наявність дефектів її структури (% зразків, що не відповідають фармакопейним вимогам).

ТП 10.1 Заморожування напівфабрикату Лактобактерину

Лактобактерин заморожують за температури -60°C упродовж 48 год. Оптимальним режимом заморожування біомаси є повільний режим, що пов'язано зі збереженням цілісності бактеріальної клітини на стадії заморожування. Повільний режим заморожування проводять за наступною схемою: препарат, який знаходиться за кімнатної температури ($20-22^{\circ}\text{C}$) охолоджують до мінус 20°C протягом 5 годин; витримують за даної температури 5 годин. Від мінус 20°C температуру препарату знижують до мінус 30°C протягом 8 годин; витримували препарат при вказаній температурі 10 годин. Від мінус 30°C температуру знижують до мінус $50-60^{\circ}\text{C}$ за 5 годин і витримують при цій температурі протягом 15 годин. Загальна тривалість процесу заморожування 48 годин [56].

ТП 10.2 Сублімаційне сушіння напівфабрикату Лактобактерину

Сублімаційне сушіння замороженого препарату здійснюють під вакуумом (26,6 Па). У сушильній камері, що називається субліматором, знаходяться порожнисті плити, усередині яких циркулює гаряча вода. На плитах встановлюють дека з матеріалом, що висушується у флаконах. Заморожений продукт сушать за рахунок випаровування з нього вологи при

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

підведенні тепла при створенні вакууму. Найбільш оптимальним з економічної точки зору та для отримання кінцевого продукту належної якості є наступний режим сушіння. Полиці витримують при температурі мінус 35-40 °С та мінімальному тиску в камері (4,0 – 6,0) Па протягом 8 год, далі їх нагрівають дотримуючись такої послідовності: від мінус 35-40 °С до мінус 20 °С зі швидкістю 2 °С/год; від мінус 20 °С до мінус 10 °С зі швидкістю 2 °С/год; від мінус 10 °С до 0 °С зі швидкістю 2 °С/год; від 0 °С до + 10 °С зі швидкістю 2 °С/год; від + 10 °С до +20°С зі швидкістю 2,5 °С /год; від +20 °С до + 30 °С зі швидкістю 1,5 °С/год. Після досягнення препаратом температури + 34 °С (мінімальний тиск в камері 4,0 Па) його витримують за даної температури протягом 6 год. В загальному процес ліофілізації триває 70 годин при повільному заморожуванні [57]. Оптимальним розміром залишкової вологості є (2,0 – 3,5) %, яка досягається при досушуванні препарату при 34°С протягом (6—10) годин. Зниження залишкової вологості менше (1,0–1,5) % призводить до погіршення розчинності при регідратації препарату. Вміст КУО в одному флаконі має становити не менше $6 \cdot 10^9$.

ТП 11 Закупорювання флаконів із Лактобактерином

По закінченню процесу ліофільного висушування флакони із сухою мікробною масою герметизують у атмосфері вакууму за допомогою напіваавтоматичної системи. Флакони з препаратом вивантажують та обкатують алюмінієвими ковпачками на пристрої для закупорювання флаконів [58].

ПМВ 12 Фасування та пакування готового Лактобактерину

По 10 флаконів препарату та інструкцію з його використання вкладають у пачку за ОСТ 64-071-89 з картону коробкового за ГОСТ 7933-89 з перегородками або гофрованою вкладкою, або з полімерною вкладкою з плівки полівінілхлоридної для розміщення та фіксації флаконів. На флакони наклеюють етикетку з етикеткового паперу за ГОСТ 7625-86 або з паперу для письма за ГОСТ 18510-87, або етикетку на липкій основі.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

На флакон фарбою глибокого друку для скляних виробів за ТУ У 42.34.011—97 українською або російською мовою наносять: назву препарату, кількість доз, номер серії, термін придатності. На етикетці флакону українською та російською мовами вказують: виробника, товарний знак, назву препарату латинською, українською та російською мовами, кількість доз, номер серії, термін придатності. На пачці та етикетці групової тари українською та російською мовами наносять: «Україна», виробник, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською та російською мовами, лікарську форму, кількість доз, кількість флаконів, «Для застосування перорально», умови зберігання, «Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер у країні імпортерів (за потреби). Номер серії та термін придатності допускається наносити збоку пачки методом тиснення. На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок [1].

ЗВ 13 Знешкодження відходів та викидів

Знешкодженню після завершення виробничого процесу підлягають конденсат, відпрацьоване повітря, промивні води, миючі та дезінфікуючі розчини, некондиційна первинна тара, відпрацьований фільтрувальний матеріал, інокулят, який не пройшов перевірку на стерильність тощо.

Залежно від якості стічних вод можливі різні методи їх очищення (наприклад, отримання оборотної води, яка реалізується повторно у виробничому процесі). Так, одні з них можуть бути названі умовно чистими, оскільки вони майже не відрізняються від споживаної у виробництві природної води (конденсат, вода з теплообмінників і та, яка подається в сорочку ферментера тощо). Інші води є забрудненими неорганічними і органічними сполуками, що потрапляють від миття приміщень, технологічного обладнання. Умовно чисті води можуть бути використані повторно в технологічних процесах, або спрямовані у водойми; забруднені води звільняють від механічних домішок, а потім направляють на знешкодження.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

При реалізації виробничого процесу необхідно здійснювати постійний (безперервний) контроль за якістю відпрацьованого повітря, що викидається в атмосферу Поряд з традиційними системами для очищення газових викидів на основі фільтрувальних матеріалів все частіше використовуються біоскрубери в рідкофазному і твердофазному виконанні з використанням іммобілізованих мікроорганізмів.

Посівний матеріал, що не пройшов випробування на стерильність, піддають термічній обробці насиченою водяною парою та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

Дезінфікуючі розчини та розчини синтетичних миючих засобів, які були задіяні у санітарній обробці виробництва після використання направляють до збірника нейтралізації стічних вод, де розводять водою в 3-4 рази, встановлюють рН на рівні 7,0 за допомогою розчинів соляної кислоти чи їдкого натру, та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

Знешкодженню підлягає також відпрацьований фреон, який в процесі сублімаційного сушіння циркулює в якості холодоагенту в міжтрубному просторі конденсатора-виморожувача. Фреон відноситься до ксенобіотиків, які вимагають обробки спеціальними препаратами для біодеградації.

Тверді відходи виробництва у вигляді битих скломатеріалів, фільтрувальних елементів, картонних коробок, бракованих флаконів, пробок та ковпачків утилізуються на міському сміттєзвалищі.

ПВ 14 Переробка відходів та викидів

Переробці для повторного використання підлягає умовно чиста вода, яка подається для охолодження в сорочку ферментеру, посівного апарату при охолодженні поживних середовищ. За рахунок тонкого очищення таких вод за допомогою фільтрації через піщані шари, хлорування, фільтрації через активоване вугілля, можна отримати воду, придатну до повторного використання [35].

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

4.4. Матеріальний баланс

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс виробничої серії Лактобактерину за стадіями виробничого культивування, стабілізації культуральної рідини, розливу напівфабрикату Лактобактерину у флакони, сушіння напівфабрикату, закупорювання флаконів, фасування та пакування готового Лактобактерину

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
Стадія ТП 7 Виробниче культивування							
Поживне середовище			225	Культуральна рідина			266
Посівний матеріал			45	Втрати			14
Розчин глюкози 40%			10				
Всього:	280			Всього:	280		
Стадія ТП 8 Стабілізація культуральної рідини							
Культуральна рідина			266	Напівфабрикат Лактобактерину			337
Розчин аміаку 5%			2				
Сахарозо-молочне середовище			66,5				
Розчин желатози			2,5				
Всього:	337			Всього:	337		

Стадія ТП 9 Розлив напівфабрикату Лактобактерину у флакони							
Напівфабрикат Лактобактерину			337	Розлитий напівфабрикат Лактобактерину, в тому числі: препарату, флаконів, гумових пробок		37000 37000	333
Флакони		37000		Втрати (1%)			4
Гумові пробки		37000					
Всього:	74337			Всього:	74337		
Стадія ТП 10 Сушіння напівфабрикату Лактобактерину							
Розлитий напівфабрикат Лактобактерину, в тому числі: препарату, флаконів, гумових пробок		37000 37000	333	Сухий препарат Лактобактерину у флаконах, в тому числі: препарату, флаконів, гумових пробок	148	37000 37000	
				Конденсат			180
				Втрати продукту (2%)	3		
				Технологічні втрати	2		
Всього:	74333			Всього:	74333		

Стадія ТП 11 Закупорювання флаконів із Лактобактерином							
Сухий препарат Лактобактерину у флаконах, в тому числі: препарату, флаконів, гумових пробок	148	37000 37000		Закупорені флакони з готовим препаратом Лактобактерину, в тому числі: препарату, флаконів, гумових пробок, алюмінієвих ковпачків	148	37000 37000 37000	
Алюмінієві ковпачки		37000					
Всього:	111148			Всього:	111148		
Стадія ПМВ 12 Фасування та пакування готового Лактобактерину							
Закупорені флакони з готовим препаратом Лактобактерину, в тому числі: препарату, флаконів, гумових пробок, алюмінієвих ковпачків	148	37000 37000 37000		Розфасований та упакований готовий препарат Лактобактерину, в тому числі: препарату, флаконів, гумових пробок, алюмінієвих ковпачків, картонних коробок	148	37000 37000 37000 3700	
Картонні коробки		3700					
Всього:	114848			Всього:	114848		

4.5. Контроль виробництва

Цільовий продукт повинен відповідати аналітичній нормативній документації та вимогам належної виробничої практики. З цією метою необхідне проведення контролю виробництва на кожній із стадій виробничого циклу.

Таблиця 4.3. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю, (показник, що вивчається)	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Підготовка персоналу К _м 1.1	Технологічний одяг та руки персоналу (мікробіологічна контамінація)	Бактеріологічний контроль	Кожну операцію	Класи чистоти, КУО: А – < 1; В – не більше 5; С – не більше 25; D – не більше 50
ДР 1.2.1 Підготовка розчину перекису водню К _х 1.2.1	Розчин перекису водню (концентрація)	Концентратомір	Кожну операцію	6%
ДР 1.2.2 Підготовка розчину хлоргексидину біглюконату К _х 1.2.2	Розчин хлоргексидину біглюконату (концентрація)	Концентратомір	Кожну операцію	0,1-0,2%
ДР 1.2.3 Підготовка розчину миючого засобу К _х 1.2.3	Розчин миючого засобу (концентрація)	Концентратомір	Кожну операцію	0,5%
ДР 1.3.1 Приготування фізіологічного розчину К _х 1.3.1, К _т 1.3.1	Наважка натрію хлориду	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	0,9 г
	Тривалість стерилізації	Годинник		30 хв
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Температура стерилізації	Термометр		132 °C

ДР 1.3.2 Приготування розчину аміаку К _х 1.3.2	Розчин аміаку (концентрація)	Концентратомір	Кожну операцію	5%
ДР 1.3.3 Приготування стерильного розчину глюкози К _х 1.3.3, К _т 1.3.3, К _м 1.3.3	Тривалість стерилізації	Годинник	Кожну операцію	30 хв
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Температура стерилізації	Термометр		120 °С
	Концентрація глюкози	Концентратомір		40%
	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі з МПА та інкубування, візуально		Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 1.3.4 Приготування розчину желатози К _т 1.3.4	Наважка сухого желатину	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	250 г
	Температура	Термометр		18 °С
	Тривалість набухання	Годинник		3 год
	Перемішування	Тахометр		120 об/хв
ДР 1.3.5 Стерилізація розчину желатози К _т 1.3.5, К _м 1.3.5	Тривалість стерилізації	Годинник	Кожну операцію	25 хв
	Температура стерилізації	Термометр		121 °С
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі з МПА та інкубування		Відсутність сторонньої мікрофлори

Продовження таблиці 4.3.

ДР 1.4 Підготовка виробничих приміщень К _м 1.4	Мікробіологічна контамінація	Бактеріологічний контроль	Кожну операцію	Класи чистоти, КУО: А – < 1; В – не більше 5; С – не більше 25; D – не більше 50
ДР 1.5 Підготовка обладнання та комунікацій К _м 1.5, К _т 1.5	Тривалість стерилізації обладнання	Годинник	Кожну операцію	1 год
	Тиск	Манометр		0,2 МПа
	Температура стерилізації обладнання	Термометр		140°C
	Мікробіологічна контамінація поверхонь обладнання	Бактеріологічний контроль		Класи чистоти, КУО/м ³ : А – < 1; В – не більше 5; С – не більше 25; D – не більше 50
ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря для чистих приміщень К _м 2.1.1, К _т 2.1.1, К _т 2.1.2, К _т 2.1.3, К _т 2.1.4, К _т 2.1.5, К _м 2.1.5, К _м 2.1.6, К _т 2.1.6	Тиск	Манометр	Протягом процесу	0,2-0,3 МПа
	Температура	Термометр		18-20°C
	Вологість	Психрометр		60%
	Ефективність роботи повітряних фільтрів	Лічильник аерозольних часток		Відповідно до виробничого регламенту
	Мікробіологічна контамінація повітря робочих зон	Бактеріологічний контроль за допомогою апарату Кротова		Класи чистоти, КУО/м ³ : А – < 1; В – не більше 10; С – не більше 100; D – не більше 200

Продовження таблиці 4.3.

ДР 2.2 Підготовка технологічного повітря К _Т 2.2.1, К _М 2.2.1, К _Т 2.2.2, К _Т 2.2.3, К _Т 2.2.4, К _Т 2.2.5, К _Т 2.2.6, К _Т 2.2.7, К _М 2.2.7	Тиск	Манометр	Протягом процесу	0,2-0,3 МПа
	Температура	Термометр		20-36°C
	Вологість	Психрометр		60%
	Ефективність роботи повітряних фільтрів	Лічильник аерозольних часток		Механічних часток менше 0,7 мг/м ³
	Мікробіологічна контамінація технологічного повітря	Пробовідбірник із мікроорганізмом <i>Bacillus stearothermophilus</i>		КУО=0,001 од
ДР 3 Підготовка води очищеної К _Т 3.1, К _Т 3.2, К _Т 3.3, К _Т 3.4, К _Т 3.5, К _М 3.5	Тиск для очищення води у блоці фільтрації	Манометр	Протягом процесу	0,4 МПа
	Тиск для очищення води у блоці ДТ-модулів	Манометр		4 МПа
	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів у воді очищеній	Інкубація при температурі 30-35 °С протягом 5 діб на густому поживному середовищі 5		Менше 100 життєздатних аеробних мікроорганізмів в 1 мл води очищеної
	Питома електропровідність води очищеної	Кондуктометр (ЕС метр)		4,3 мкСм/см
ДР 4.1.1 Приготування печінкового екстракту К _Т 4.1.1	Перемішування	Тахометр	Кожну операцію	120 об/хв
	Тривалість перемішування	Годинник		1 год
	Температура	Термометр		90 °С
ДР 4.1.2 Приготування дріжджового автолізу К _Т 4.1.2, К _Х 4.1.2	Температура автолізу дріжджів	Термометр	Кожну операцію	56-58 °С
	Тривалість автолізу	Годинник		48 год
	Перемішування	Тахометр		120 об/хв
	Вміст амінного азоту в дріжджовому автолізаті	Метод формольного титрування		150-180мг%

Продовження таблиці 4.3.

ДР 4.1.3 Приготування гідролізату знежиреного молока К _т 4.1.3, К _х 4.1.3	рН гідролізату	Потенціометричний метод	Кожну операцію	7,7
	Температура	Термометр		40 °С
	Тривалість нагрівання	Годинник		72 год
ДР 4.1.4 Фільтрація гідролізату знежиреного молока К _т 4.1.4	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 4.1.5 Приготування розчину компонентів поживного середовища МРС-1 К _т 4.1.5, К _х 4.1.5	Дозування компонентів	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Відповідно до пропису приготування поживного середовища
	Перемішування	Тахометр		120 об/хв
	Тривалість перемішування	Годинник		15 хв
	Температура	Термометр		70 °С
	рН	Потенціометричний метод		6,4
ДР 4.1.6 Нагрівання поживного середовища МРС-1 К _т 4.1.6	Температура	Термометр	Кожну операцію	121 °С
	Тривалість нагрівання	Годинник		10 хв
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
ДР 4.1.7 Витримування поживного середовища МРС-1 К _т 4.1.7	Температура	Термометр	Кожну операцію	121 °С
	Тривалість витримування	Годинник		30 хв
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
ДР 4.1.8 Охолодження поживного середовища МРС-1 К _т 4.1.8, К _м 4.1.8	Тривалість охолодження	Годинник	Кожну операцію	25 хв
	Температура	Термометр		37 °С
	Мікробіологічна чистота середовища	Висів на чашки Петрі з МПА та інкубування, візуально		Відсутність сторонньої мікрофлори

Продовження таблиці 4.3.

ДР 4.2.1 Приготування панкреатичного гідролізату казеїну К _т 4.2.1, К _х 4.2.1	рН гідролізату	Потенціометричний метод	Кожну операцію	8,0-8,2
	Тривалість витримування	Годинник		120 год
	Температура	Термометр		58-62 °С
	Вміст амінного азоту в панкреатичному гідролізаті казеїну	Метод формольного титрування		450-600 мг%
ДР 4.2.2 Фільтрація панкреатичного гідролізату казеїну К _т 4.2.2	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 4.2.3 Приготування розчину компонентів казеїново- дріжджового поживного середовища у виробничому ферментері К _т 4.2.3, К _х 4.2.3	Дозування компонентів	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Відповідно до пропису приготування поживного середовища
	Температура	Термометр		70 °С
	Перемішування	Тахометр		120 об/хв
	Тривалість перемішування	Годинник		15 хв
	рН розчину компонентів	Потенціометричний метод		6,4
	Вміст амінного азоту в розчині компонентів казеїново- дріжджового поживного середовища	Метод формольного титрування		150 мг%
ДР 4.2.4 Нагрівання казеїново- дріжджового поживного середовища К _т 4.2.4	Тривалість нагрівання середовища	Годинник	Кожну операцію	10 хв
	Температура	Термометр		121 °С
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
ДР 4.2.5 Витримування казеїново- дріжджового поживного середовища К _т 4.2.5	Тривалість витримування середовища	Годинник	Кожну операцію	30 хв
	Температура	Термометр		121 °С
	Тиск	Манометр		0,1 МПа

Продовження таблиці 4.3.

ДР 4.2.6 Охолодження казеїново- дріжджового поживного середовища К _т 4.2.6, К _м 4.2.6	Тривалість охолодження	Годинник	Кожну операцію	25 хв
	Температура	Термометр		37 °С
	Мікробіологічна чистота середовища	Висів на чашки Петрі з МПА та інкубування, візуально		Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4.3.1 Фільтрація знежиреного молока від механічних вкраплень К _т 4.3.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 4.3.2 Стерилізація знежиреного молока К _т 4.3.2, К _м 4.3.2, К _х 4.3.2	рН знежиреного молока	Потенціометричний метод	Кожну операцію	7,4-7,6
	Температура стерилізації	Термометр		121 °С
	Тривалість стерилізації	Годинник		45 хв
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
	Температура охолодженого знежиреного молока	Термометр		35-40°С
	Мікробіологічна чистота знежиреного молока	Висів на чашки Петрі з МПА та інкубування, візуально		Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4.3.3 Приготування композиції сахарозо-молочного середовища К _т 4.3.3, К _х 4.3.2	Концентрація сахарози у середовищі	Рефрактометричний метод	Кожну операцію	30-32 %
	Перемішування	Тахометр		120 об/хв
	Тривалість перемішування	Годинник		10-15 хв

Продовження таблиці 4.3.

ДР 4.3.4 Нагрівання сахарозо-молочного середовища до температури стерилізації К _Т 4.3.4	Температура стерилізації	Термометр	Кожну операцію	121 °С
	Тривалість нагрівання	Годинник		10 хв
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
ДР 4.3.5 Витримування сахарозо-молочного середовища К _Т 4.3.5	Температура	Термометр	Кожну операцію	121 °С
	Тривалість витримування	Годинник		45 хв
	Тиск	Манометр		0,1 МПа
ДР 4.3.6 Охолодження сахарозо-молочного середовища К _Т 4.3.6, К _М 4.3.6	Тривалість охолодження	Годинник	Кожну операцію	25 хв
	Температура	Термометр		35-40°С
	Мікробіологічна чистота середовища	Висів на чашки Петрі з МПА та інкубування, візуально		Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 5 Підготовка первинного пакування (флаконів, гумових пробок та алюмінієвих ковпачків) К _Т 5.1, К _Т 5.2, К _Т 5.3, К _Т 5.4, К _Т 5.5, К _М 5.5	Режим миття первинних пакувальних матеріалів (температура, тривалість)	Термометр, годинник	Кожну операцію	50-60°С, 1-2 хв
	Режим стерилізації первинних пакувальних матеріалів (температура, тривалість)	Термометр, годинник		200°С, 1 год
	Температура охолодження первинних пакувальних матеріалів	Термометр		18°С
	Граничний вміст залишкової вологості	Аналітичні ваги		Не більше 5% від обсягу флакона
	Мікробіологічна чистота первинного пакування	Посів на ГРМ-бульйон у флакони, на ГРМ-агар у чашки Петрі та інкубування при 37°С протягом 48 год, візуально		Відсутність сторонньої мікрофлори

Продовження таблиці 4.3.

ТП 6.1 Одержання культури I генерації К _т 6.1, К _м 6.1	Кількість фізіологічного розчину	Ваги, мірний посуд	Постійно протягом процесу	1 см ³ на дозу робочої культури
	Кількість поживного середовища МРС-1	Ваги, мірний посуд		5-7 мл у пробірці
	Температура інкубування	Термометр		37°C
	Тривалість інкубування	Годинник		24 год
	Мікробіологічна чистота культури I генерації	Висів на чашки Петрі з МПА з 5 % глюкози і на середовище Сабуро, інкубування 48-72 год, мікроскопіювання	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 6.2 Одержання культури II генерації К _т 6.2, К _м 6.2	Кількість поживного середовища МРС-1	Ваги, мірний посуд	Постійно протягом процесу	500-550 мл у колбі
	Температура інкубування	Термометр		37°C
	Тривалість інкубування	Годинник		40 год
	Мікробіологічна чистота культури II генерації	Висів на чашки Петрі з МПА з 5 % глюкози і на середовище Сабуро, інкубування 48-72 год, мікроскопіювання	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори

Продовження таблиці 4.3.

ТП 6.3 Одержання культури III генерації К _т 6.3 К _м 6.3	Кількість поживного середовища МРС-1	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	40-50 л
	Температура інкубування	Термометр		37°C
	Тривалість інкубування	Годинник		24 год
	Кількість життєздатних клітин	Висів на чашки Петрі з агаризованим середовищем МРС, інкубування, підрахунок живих клітин за допомогою лічильника колоній бактерій (ПСБ)		Не менше ніж 10 ⁹ КУО/см ³
	Мікробіологічна чистота культури III генерації	Висів на чашки Петрі з МПА з 5 % глюкози і на середовище Сабуро, інкубування 48-72 год, мікроскопіювання		Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 7 Виробниче культивування К _т 7, К _м 7, К _х 7	Кількість казеїново-дріжджового середовища	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	225 л
	Кількість мікробної суспензії <i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	Дозуючий пристрій, ваговий метод		45 л
	Кількість розчину глюкози	Дозуючий пристрій, ваговий метод		10 л
	Температура	Термометр		37 °C
	Тривалість культивування	Годинник		8-10 год
	pH	Потенціометричний метод		6,8-7,0
	Тиск	Манометр		0,03-0,04 МПа
	Перемішування	Тахометр		200 об/хв
	Кількість життєздатних клітин <i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	Висів на чашки Петрі з середовищем МРС, інкубування, підрахунок живих клітин (ПСБ)		Не менше ніж 10 ⁹ КУО/см ³

Продовження таблиці 4.3.

ТП 8 Стабілізація культуральної рідини К _т 8, К _м 8, К _х 8	Кількість захисного сахарозо-молочного середовища	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	66,5 л
	Кількість розчину желатози	Дозуючий пристрій, ваговий метод		2,5 л
	pH	Потенціометричний метод		6,0-6,5
	Мікробіологічна чистота культуральної рідини	Висів на чашки Петрі з МПА з 5 % глюкози і на середовище Сабура, інкубування 48-72 год, мікроскопіювання		Відсутність сторонньої мікрофлори
	Кількість життєздатних клітин <i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	Висів на чашки Петрі з агаризованим середовищем МРС, інкубування, підрахунок живих клітин за допомогою лічильника колоній бактерій (ПСБ)		Не менше ніж 10 ⁹ КУО/см ³
	Активність кислотоутворення	Титриметричний метод		Одна доза напівфабрикату повинна утворювати кислоту не нижче 200 °T
ТП 9 Розлив напівфабрикату Лактобактерину у флакони К _т 9, К _м 9	Наповнення флаконів напівфабрикатом	Автоматично машиною для розливу KGS лінійного типу	Кожну операцію	По 9 мл напівфабрикату у флаконі
	Мікробіологічна чистота напівфабрикату	Висів на чашки Петрі з МПА з 5 % глюкози і на середовище Сабура, інкубування 48-72 год, мікроскопіювання		Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 10.1 Заморожування напівфабрикату Лактобактерину К _т 10.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	-60 °C
	Тривалість заморожування	Годинник		48 год

Продовження таблиці 4.3.

ТП 10.2 Сублімаційне сушіння напівфабрикату Лактобактерину К _Т 10.2, К _М 10.2, К _Х 10.2	Температура	Термометр	Кожну операцію	34 °С
	Тривалість сушіння	Годинник		22 год
	Тиск	Манометр		26 Па
	Залишкова вологість	Гравіметричний метод		2,0-3,5%,
	Кількість живих клітин <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> 8P-A3	Метод серійних розведень з наступним висівом на чашки Петрі з МРС-4, інкубування, підрахунок живих клітин за допомогою лічильника колоній бактерій (ПСБ)		Не менше ніж 2·10 ⁹ КУО в одній дозі препарату
	Мікробіологічна чистота препарату	Приготування гомогенної зависі ліофілізату і висів на чашки Петрі з густим поживним середовищем № 1 та на чашки Петрі з густим поживним середовищем № 2, інкубування, мікроскопіювання		Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 11 Закупорювання флаконів із Лактобактерином К _Т 11	Герметичність флаконів	Метод занурення флаконів у посудину з розчином метиленового синього 0,025 %, візуально	Кожну операцію	Одна доза препарату повинна утворювати кислоту не нижче 200 °Т
ПМВ 12 Фасування та пакування готового Лактобактерину К _Т 12	Кількість флаконів препарату та інструкцій його використання у картонних коробках	Візуально	Кожну операцію	По 10 флаконів препарату та 1 інструкції у картонній коробці

Продовження таблиці 4.3.

ЗВ 13 Знешкодження відходів та викидів К _х 13	Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних норм і правил
ПВ 14 Переробка відходів та викидів К _х 14, К _т 14	Наявність хімічних, механічних, мікробіологічних забруднень	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД для конкретного матеріалу чи речовини

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Інокулятор для вирощування посівного матеріалу мікроорганізмів з використанням рідкофазних поживних середовищ - найбільш специфічний апарат мікробіологічного виробництва. Основними вимогами до такого апарату є забезпечення в культуральній рідині заданої концентрації розчиненого кисню, відведення діоксиду вуглецю, створення однорідного поля концентрацій компонентів культуральної рідини, забезпечення тепло-масообмінних процесів, необхідних для росту і розвитку мікроорганізмів.

Існує велика кількість інокуляторів різного типу для вирощування мікроорганізмів, проте всі конструкції таких апаратів в основному подібні за більшістю параметрів і, усереднено, їх можна поділити на 2 типи: без підведення стерильного повітря (для анаеробів) і з підведенням (для аеробів). За способом підведення енергії на перемішування розрізняють:

- інокулятори з підведенням енергії з газовою фазою (барботажні, ерліфтні, тарілчасті),
- інокулятори з підведенням енергії з рідкою фазою (конструкції із самовсмоктувальними мішалками, ежекційні, струменеві),
- інокулятори з підведенням енергії з газовою та рідкою фазою (конструкції з перемішувачами і барботерами) [59].

При вирощуванні посівного матеріалу в аеробних умовах необхідно постійно забезпечувати надходження у середовище кисню. В залежності від цього відрізняються і конструкції інокуляторів. В посівних апаратах з механічним диспергуванням газу, повітря, що вводиться в рідину

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив	Державцева Ю.І.					Д	97	131
Консульт.						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Керівник	Олійник Н.М.							
Затвер.								

диспергується за допомогою перемішуючих пристроїв. Струминні ферментери мало розповсюджені і в них газ вводиться через спеціальні інжекційні пристрої і розподіляється за допомогою спеціальних насадок. В ерліфтних інокуляторах поверхня розподілу фаз формується за рахунок введення газу через газорозподільчий пристрій, і така конструкція є більш поширеною у промисловому використанні. Посівний апарат з ерліфтом зображено на рисунку 5.1.

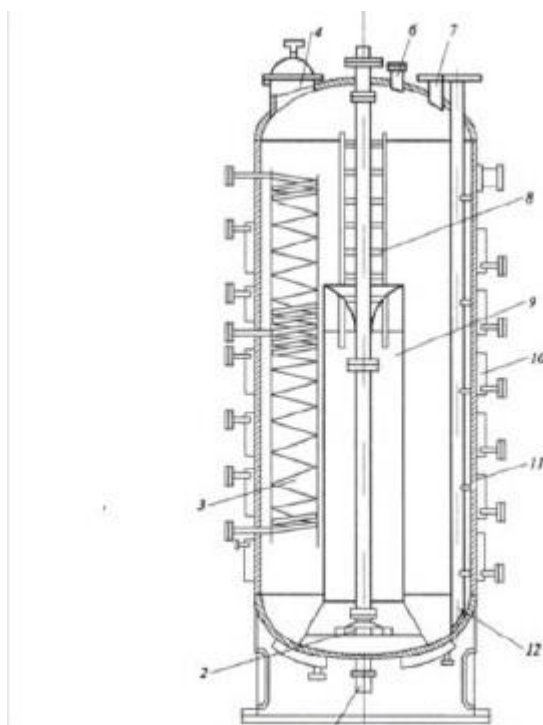


Рисунок 5.1 – Схема інокулятора з ерліфтом [60]

1 – штуцер для вивантаження посівного матеріалу, 2 – аератор, 3 – внутрішній змійовик, 4 – люк, 5 – штуцер для подачі повітря, 6 – штуцер для відведення повітря, 7 – штуцер для завантаження, 8 – драбина, 9 – дифузор, 10 – секційна сорочка, 11 – корпус, 12 – труба перетискання.

В даному апараті відсутнє механічне перемішування, тому простіше підтримувати асептичні умови. Повітря для аерації середовища подається по трубі, розташованій вертикально в інокуляторі. Аератор, конструкція якого забезпечує вихровий рух вихідного повітря, розташований в нижній частині дифузора і насичує поживне середовище повітрям. Газорідинна суміш

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		98

піднімається по дифузору і перемішується через його верхні краї. У цій же зоні частина повітря виходить із апарату, і більш щільне середовище опускається вниз в кільцевому просторі між корпусом посівного апарату і дифузоре. Так відбувається багаторазова циркуляція середовища в інокуляторі. Для відведення біологічного тепла всередині апарату встановлений змішувач, а також апарат оснащений секційною сорочкою [60].

Широке поширення в фармацевтичному виробництві отримали інокулятори із самовсмоктуючими мішалками (рисунок 5.2). Такий інокулятор являє собою вертикальний циліндричний апарат, забезпечений циркуляційними, теплообмінними і аеруючими пристроями. В якості циркуляційних пристроїв використані системи направляючих дифузорів, що розмежовують висхідні та низхідні потоки. Теплообмінні пристрої виконані у вигляді трубок, встановлених в трубних решітках дифузорів [61].

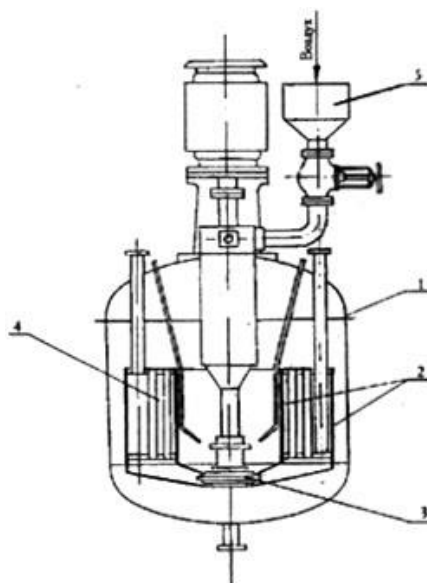


Рисунок 5.2. Схема інокулятора із самовсмоктуючою мішалкою [61]

1 - корпус, 2 - дифузор, 3 - самовсмоктуюча мішалка, 4 - теплообмінник, 5 - фільтр.

Оскільки продуцент Лактобактерину належить до факультативних анаеробів, то використання вищенаведених конструкцій ерліфтного та

інокулятора із самовсмоктуючою мішалкою не є доцільним через наявність аеруючих пристроїв.

Найбільш підходящим для використання при виробництві пробіотичного препарату Лактобактерину є посівний апарат з механічним перемішуванням та відсутністю подачі аераційного повітря. Він має механічну мішалку, що складається із центрального вала й лопат різної форми. В систему перемішування входять також відбивні перегородки – вузькі металеві пластини, прикріплені до внутрішніх стінок інокулятора для підвищення ефективності перемішування.

Для вибору оптимальної мішалки розглянемо основні типи, що використовуються в біотехнологічній промисловості:

1. Лопатеві мішалки рекомендується застосовувати при перемішуванні з метою суспендування, розчинення й при проведенні хімічних реакцій. Вони прості за конструкцією, але працюють недостатньо інтенсивно. Як правило лопатеві мішалки низькооборотні, з двома лопатками. Ці мішалки використовуються, коли немає необхідності в інтенсивній радіально – осьовій циркуляції рідини в апараті.

2. Рамні мішалки використовують у випадках, коли необхідно забезпечити більше інтенсивне перемішування по висоті, а також при перемішуванні в'язких рідин у великому об'ємі.

3. Якірний тип мішалок доцільно застосовувати для перемішування в'язких рідин, для інтенсифікації теплообміну й запобігання випадіння осаду на стінках і днищі апарата.

4. Турбінні мішалки використовують у всіх випадках, коли необхідно інтенсивне перемішування, особливо рідин, що значно розрізняються по в'язкості, а також при диспергуванні газу в рідині. Також їх використовують при розчиненні твердих кристалічних часток, емульгуванні рідин з великою різницею густин. Якщо лопатки мішалки знаходяться в корпусі таким чином, що вони утворюють закриті канали подібні ротору центробіжного насоса, то таку мішалку називають закритою турбінною мішалкою. У відкритих

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						100
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

мішалках лопатки не знаходяться в корпусі. Найбільш простою й високоефективною серед відкритих турбінних мішалок є мішалка з прямими лопатками, які розміщені радіально.

З усіх можливих механічних перемішувачів найбільшою швидкістю обертання характеризується турбінна мішалка ($0 \dots 22,5 \text{ с}^{-1}$). Перевагами даного типу мішалки є також менша маса та низька вартість порівняно з рамною та лопатевою. Тому враховуючи усі корисні параметри приймаємо до установки відкриту турбінну мішалку (рисунок 5.3) [62, 63].

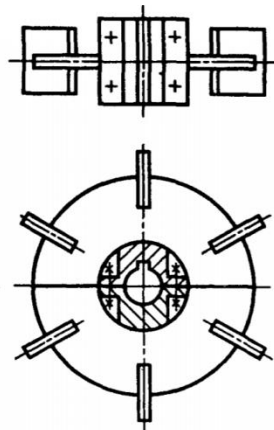


Рисунок 5.3. Турбінна мішалка [63]

Вибір оптимальної конструкції

Оскільки вирощування досліджуваного продуценту *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 проводять в умовах анаеробного культивування, то підвід повітря не є необхідним, тому приймаємо до виробничого процесу наступну конструкцію (рисунок 5.4.):

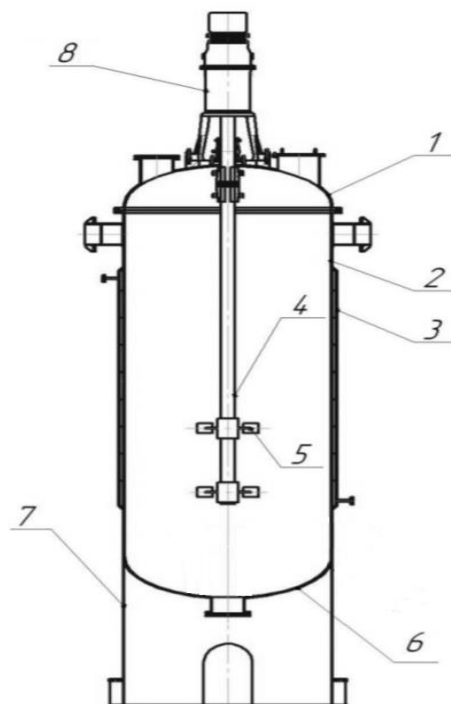


Рисунок 5.4. Схематичне зображення посівного апарату [62]

1 – кришка; 2 – корпус; 3 – сорочка; 4 – вал; 5 – перемішуючий пристрій; 6 – днище; 7 – опора, 8 – привід

Апарат складається з корпусу 2, еліптичного днища 6 та знімної кришки 1 для проведення профілактичного обслуговування. Всередині знаходиться перемішуючий пристрій – відкриті турбінні мішалки 5, що розташовані у два яруси та закріплені на валу 4. При вирощуванні мікроорганізму-продуцента необхідно підтримувати температуру середовища на рівні 37°C подачею гарячої води з температурою 40°C в сорочку 3 інкулятора. Теплообмінна сорочка оснащена верхнім штуцером для подачі теплоносія та нижнім штуцером для зливу відпрацьованого теплоносія. В посівному апараті встановлено термогільзу із датчиком контролю температури, датчик вимірювання рН та манометр.

Принцип дії полягає у завантаженні в апарат поживного середовища та посівної культури *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 для отримання посівного матеріалу. Для перемішування біомаси в інкуляторі вмонтований вал з турбінною мішалкою. Описана вище конструкція задовольняє поставленим

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						102
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

вимогам та забезпечує оптимальні умови процесу для вирощування посівного матеріалу [62].

До конструкції інокулятора передбачено великі вимоги відносно герметичності. Зварювання швів має бути щільним. Виділення вологи на зварних швах при гідравлічних випробовуваннях не допускається, так як це може призвести до потрапляння інфекції у культуральне середовище. Необхідно також забезпечити щільність сальнику робочого валу апарату, прокладок люків та фланцевих з'єднань. Для забезпечення герметичності апаратів з механічними перемішувачами пристроями використовують ущільнення, головним чином, подвійні торцеві, що дозволяють попередити втрату робочого середовища з апарату та не допускають потрапляння повітря всередину конструкції.

Матеріали, з яких виготовляють конструкційні елементи інокулятора повинні забезпечувати міцність і стійкість цих елементів. Матеріали елементів апарату, поверхні яких контактують з робочим середовищем (мішалка, вал, корпус, днище, кришка) повинні бути хімічно інертними, нетоксичними до робочого середовища та корозійностійкими, а також витримувати обробку дезінфікуючими засобами та стерилізацію [64]. Враховуючи призначення даної конструкції та необхідність відповідати умовам GMP контактуюча із вирощуваною біомасою лактобактерій внутрішня поверхня апарату виготовляється із медичної нержавіючої сталі з молібденом AISI316L, а сорочка і облицювання із сталі AISI304L (08X18H10).

Для попередження інфікування під час вирощування посівного матеріалу в процесі роботи під кришкою апарату надлишковий тиск має становити 0,3 МПа [60].

					<i>ПБ.БТ6206.ДП</i>	Арк.
						103
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Технічна характеристика вибраної конструкції посівного апарату

1. Апарат призначено для вирощування посівного матеріалу
Lactobacillus plantarum 8P-A3 для виробництва Лактобактерину.

2. Робочий об'єм, 0,06
м³.

3. Тип перемішуючого пристрою – мішалка відкрита турбінна
шестилопатева..

4. Кількість мішалок 2.

5. Кількість відбивних перегородок 0.

6. Частота обертання вала мішалки, 3,33 с⁻¹.

7. Потужність електродвигуна 0,12 кВт.

8. Габаритні розміри:

- ширина 550 мм;

- довжина 665 мм;

- висота 1350 мм.

9. Маса 185 кг.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						104
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Конструктивний розрахунок посівного апарату

Метою конструктивного розрахунку є визначення розмірів посівного апарату та основних конструктивних елементів.

Вихідні дані:

Загальний об'єм апарату	$V_H = 0,1 \text{ м}^3$
Робочий об'єм апарату	$V_p = 0,06 \text{ м}^3$;
Коефіцієнт заповнення	$K_3 = 0,6$;
Коефіцієнт динамічної в'язкості	$\mu = 1,55 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$
Густина середовища в реакторі	$\rho = 1060 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$
Тип перемішуючого пристрою	відкрита турбінна шестилопатева мішалка
Кількість мішалок	$m = 2$
Частота обертання валу мішалки	$n = 1 \text{ с}^{-1}$

Для отримання посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою (тип 0). За ГОСТ 20680–86 приймаємо внутрішній діаметр апарату [65]:

$$D_{\text{вн}} = 500 \text{ мм} = 0,5 \text{ м.}$$

Розрахуємо розміри днища апарату. Висота еліптичної частини днища:

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}};$$

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot 500 = 125 \text{ мм} = 0,125 \text{ м.}$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища посівного апарату [66]:

внутрішня поверхня еліптичного днища :	$F = 0,31 \text{ м}^2$
висота відбортової частини:	$h_1 = 25 \text{ мм} = 0,025 \text{ м}$
товщина стінки еліптичного днища :	$S_{\text{дн}} = 5 \text{ мм} = 0,005 \text{ м}$
об'єм еліптичного днища :	$V_{\text{дн}} = 11,5 \text{ дм}^3 = 0,0115 \text{ м}^3$
маса днища :	$m_{\text{дн}} = 12,5 \text{ кг}$

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		105

Повна висота еліптичного днища: $0,025 + 0,125 = 0,15$ м.

Подальший розрахунок проводимо за методикою [64].

Повний об'єм апарату:

$$V = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}},$$

звідки об'єм циліндричної частини реактора:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{н}} - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 0,1 - 2 \cdot 0,0115 = 0,077 \text{ м}^3.$$

Висоту циліндричної частини реактора обираємо зі стандартних габаритних типорозмірів у відповідності до внутрішнього діаметру посівного апарату:

$$H_{\text{ц}} = 0,65 \text{ м}.$$

Висота рівня рідкого поживного середовища в циліндричній частині апарату:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4(V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{4(0,06 - 0,0115)}{3,14 \cdot 0,5^2} = 0,25 \text{ м}.$$

Висота стовпа рідини в реакторі:

$$H_{\text{р}} = H_{\text{рц}} + h_{\text{дн}} = 0,25 + 0,15 = 0,4 \text{ м}.$$

Загальна висота реактору без штуцерів та опор:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 0,65 + 2 \cdot 0,15 = 0,95 \text{ м}.$$

Розрахунок перемішуючого пристрою посівного апарату

В якості пристрою для перемішування в інокуляторі знаходяться турбінні шестилопатеві мішалки, схема яких зображена на рисунку 5.5.

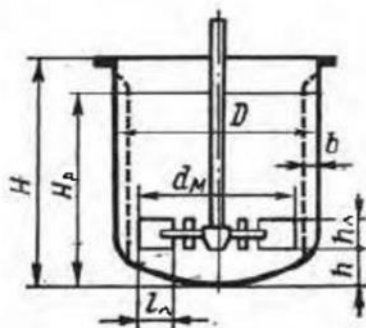


Рисунок 5.5.Схема апарату з турбінною мішалкою [67]

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		106

Діаметр турбінної мішалки визначаємо за ГОСТ 20680-86, що зазвичай знаходиться в діапазоні (0,15-0,65) $D_{\text{вн}}$ при відношенні висоти рівня рідини до діаметра апарату не більше двох[65]. Відповідно діаметр турбінної мішалки становить:

$$d_m = (0,2 - 0,4) \cdot 500 = 100 - 200 \text{ мм.}$$

Обираємо до виробничої конструкції посівного апарату стандартну турбінну мішалку діаметром 160 мм.

Розрахуємо розміри мішалки [64]:

висота лопаті:

$$h_z = 0,2 \cdot d_m = 0,2 \cdot 0,16 = 0,032 \text{ м;}$$

Ширина лопаті:

$$l_z = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,16 = 0,04 \text{ м.}$$

Висота від днища до мішалки:

$$h = 0,5 \cdot d_m = 0,5 \cdot 0,16 = 0,08 \text{ м.}$$

Коефіцієнт гідравлічного опору мішалки: $\zeta_m = 8,4$.

Частота обертів мішалки згідно з обраною технологією становить:

$$n = 200 \text{ об/хв} = 3,33 \text{ об/с}$$

Для визначення необхідності встановлення відбиваючих перегородок розрахуємо глибину воронки.

Критерій Рейнольдса [67]:

$$Re_{\text{вц}} = \frac{n \cdot d_m^2 \cdot \rho_c}{\mu_c} = \frac{3,33 \cdot 0,16^2 \cdot 1060}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 5,83 \cdot 10^4;$$

де ρ_c – густина поживного середовища в інокуляторі, кг/м^3 ; μ_c – коефіцієнт динамічної в'язкості, $\text{Па} \cdot \text{с}$.

Параметр Γ [64]:

$$\Gamma = \frac{8 \cdot H_p}{D_{\text{вн}}} + 1 = \frac{8 \cdot 0,4}{0,5} + 1 = 7,4;$$

де H_p – висота стовпа рідини в апараті; D – діаметр апарату.

Параметр гідравлічного опору мішалки E :

$$E = \frac{\Gamma}{\zeta_m \cdot z \cdot Re_{\text{вц}}^{0,25}} = \frac{7,4}{8,4 \cdot 2 \cdot (5,83 \cdot 10^4)^{0,25}} = 0,028;$$

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						107
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

де ζ_m – критерій опору; z – кількість мішалок на валу (2) шт.

Глибина воронки в посівному апараті без відбиваючих перегородок [67]:

$$h_{\text{в}} = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_m^2}{2} = \frac{2 \cdot 3,33^2 \cdot 0,16^2}{2} = 0,28 \text{ м};$$

де B – параметр, значення якого визначається з номограми [67] в залежності від E і типу мішалки.

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{\text{доп}} = H_p - h = 0,4 - 0,08 = 0,32 \text{ м.}$$

Так як глибина воронки нижче допустимого значення, встановлення відбиваючих перегородок не є необхідним. Так само немає необхідності у встановленні барботеру, через те, що вирощувана культура продуценту належить до факультативних анаеробів.

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування визначають за формулою [67]:

$$N = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_m^5$$

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						108
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

де K_N – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується центробіжним критерієм Рейнольдса. За графіком нормалі (рисунок 5.6) знаходимо значення $K_N = f(Re_{\text{ц}})$ для апарату без перегородок зі співвідношенням діаметру апарату до діаметру мішалки – $\Gamma_D = \frac{D_{\text{вн}}}{d_{\text{м}}} = \frac{500}{160} = 3,1$.

Значення $K_N = 1$.

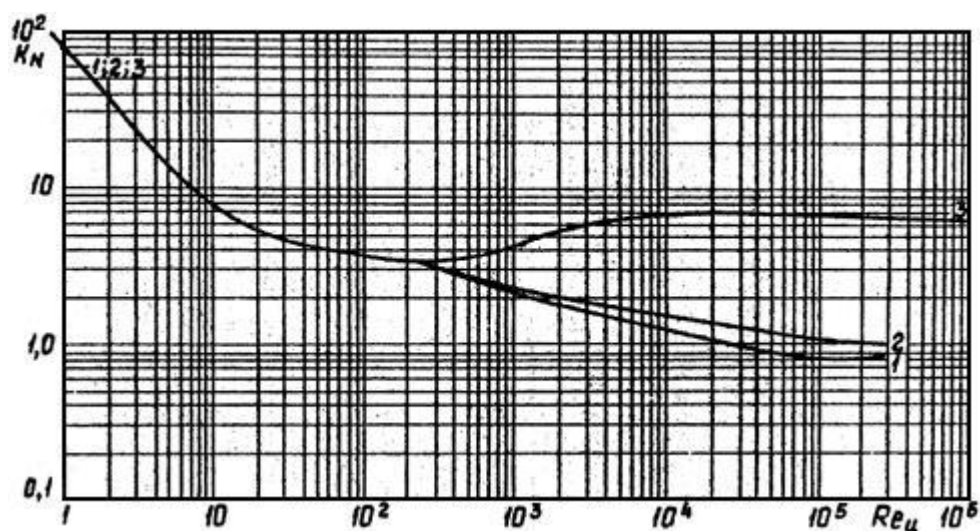


Рисунок 5.6. Число $K_N = f(Re_{\text{ц}})$ для апаратів з турбінними мішалками [67];

1 - в апараті без перегородок, $\Gamma_D=3$; 2 - в апараті без перегородок, $\Gamma_D=4$; 3 - в апараті з перегородками, $\Gamma_D=3-4$.

$$N = 1 \cdot 1060 \cdot 3,33^3 \cdot 0,16^5 = 4,1 \text{ Вт}$$

При розрахунку потужності привода мішалки необхідно врахувати потужність, що витрачається в ущільненні валу мішалки та на подолання опору внутрішніх пристроїв інокулятора. Потужність, що витрачається на тертя в ущільненнях вала мішалки залежить від діаметра вала d_e в місці ущільнення. Для вибору торцевого ущільнення визначимо діаметр вала.

Значення $d_{\text{в}}$ можна розрахувати за допомогою наближеного співвідношення [67]:

$$d_{\text{в}} = C \cdot d_{\text{м}} = 0,117 \cdot 0,16 = 0,019 \text{ м},$$

де коефіцієнт C вибирається в залежності від конструкції мішалки.

Оскільки торцеве ущільнення має високу герметичність у порівнянні з аналогами, високий ККД, високу зносостійкість, довговічність, добре працює при присутності биття вала, тому обираємо його до конструкції посівного

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		109

апарату. Обираємо тип ущільнення подвійне з термічним затвором Т1 (ТТ) – для валів апаратів зі стерильними біологічними процесами.

Потужність приводу перемішуючого пристрою розраховується за формулою [64]:

$$N_{\text{ел}} = \frac{K_n \cdot K_{\text{н}} \cdot \sum K_i \cdot N + N_{\text{ущ}}}{\eta},$$

де коефіцієнт рівня рідини в апараті:

$$K_{\text{н}} = \left(\frac{H_p}{D}\right)^{0,5} = \left(\frac{0,4}{0,5}\right)^{0,5} = 0,89.$$

K_n – коефіцієнт, що вказує на відсутність в апараті відбиваючих перегородок (1,25);

K_i – коефіцієнт, що враховує наявність в апараті внутрішніх пристроїв

($\sum K_i = 1,1$ (термометр)+1,1(манометр)=2,2);

N – потужність, що витрачається на перемішування; $N_{\text{ущ}}$ – потужність, що витрачається на подолання тертя ущільнення валу мішалки; η – ККД двигуна (0,85..0,9).

Потужність, що витрачається на подолання тертя в торцевому ущільненні розраховують по формулі:

$$N_{\text{ущ}} = 10440 \cdot d_{\text{в}}^{1,3} = 10440 \cdot 0,019^{1,3} = 60,41 \text{ Вт.}$$

Отже, потужність приводу перемішуючого пристрою:

$$N_{\text{ел}} = \frac{1,25 \cdot 0,89 \cdot 2,2 \cdot 4,1 + 60,41}{0,85} = 82,88 \text{ Вт}$$

За знайденим за формулою значенням $N_{\text{ел}}$ обираємо привід типу МРВ з $N_{\text{ел}} = 0,12 \text{ кВт}$ та $n = 25 \dots 200 \text{ хв}^{-1}$ [68].

Вибір штуцерів та опор

За АТК 24.218.06-90 обираємо штуцера: для зручності з'єднання з трубопроводами приймаємо довжини вильоту рівними 80 мм. Діаметри штуцерів: штуцер для входу і виходу води, входу поживного середовища ($D_y = 50 \text{ мм}$); штуцер технологічний ($D_y = 80 \text{ мм}$); штуцер для входу

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						110
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

посівного матеріалу та запасний ($D_y = 80 \text{ мм}$); штуцер для виходу посівного матеріалу ($D_y = 150 \text{ мм}$); штуцер для гільзи термометру, манометру та рН-метру ($D_y = M25 \times 15 \text{ мм}$). Приймаємо товщину стінок всіх штуцерів рівною 2 мм. Згідно ОН 26-01-33-66 приймаємо опори для вертикальних сталевих емальованих апаратів за $D_6 = 500 \text{ мм}$.

Тепловий розрахунок посівного апарату

Теплообмінні пристрої посівного апарату повинні забезпечувати підтримку заданої температури протягом всього циклу. Метою теплового розрахунку є визначення теплового навантаження інокулятора і поверхні теплообміну теплообмінних пристроїв апарату.

В процесах нагрівання (охолодження) середовища в посівних апаратах тепла енергія підводиться (відводиться) теплоносієм, що поступає в теплообмінні пристрої апарата: сорочку або (та) змійовик.

Теплота, що підводиться до середовища в апараті (нагрівання) або відводиться від нього (охолодження) визначається з рівняння теплового балансу. Розрахунок ведемо за надходженнями та витратами теплової енергії.

Розрахунок об'ємів поживного середовища і посівного матеріалу [64]:

$$V_p = V_{nc} + V_{nm}$$

$$V_{nc} = 0,8 \cdot V_p = 0,8 \cdot 0,06 = 0,048 \text{ м}^3;$$

$$V_{nm} = 0,2 \cdot V_p = 0,2 \cdot 0,06 = 0,012 \text{ м}^3.$$

Теплофізичні властивості поживного середовища МРС-1 при визначальній температурі – $t_{cp} = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$\rho_{кр} = \rho_{nc} = \rho_{nm} = 1060 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3};$$

$$c_{кр} = c_{nc} = c_{nm} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot x - t_{cp1});$$

$$c_{кр} = c_{nc} = c_{nm} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot 17 - 25) = 3,788 \cdot 10^3 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}.$$

Розрахунок маси поживного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини:

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						111
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$M_{nc} = \rho_{nc} \cdot V_{nc} = 1060 \cdot 0,048 = 50,88 \text{ кг};$$

$$M_{nm} = \rho_{nm} \cdot V_{nm} = 1060 \cdot 0,012 = 12,72 \text{ кг};$$

$$M_{кр} = \rho_{кр} \cdot V_{кр} = 1060 \cdot 0,06 = 63,6 \text{ кг}.$$

Надходження енергії в інокулятор для вирощування посівного матеріалу відбувається [60]:

1) з поживним середовищем:

$$E_{nc} = M_{nc} \cdot C_{nc} \cdot t_{nc}$$

$$E_{nc} = 50,88 \cdot 3788 \cdot 20 = 3,85 \text{ МДж}.$$

2) з посівним матеріалом:

$$E_{nm} = M_{nm} \cdot C_{nm} \cdot t_{nm};$$

$$E_{nm} = 12,72 \cdot 3788 \cdot 20 = 0,96 \text{ МДж}.$$

3) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

$$E_{дис_1} = N_{уст} \cdot \tau_{пер};$$

$$E_{дис_1} = 4,1 \cdot 86400 = 0,35 \text{ МДж}.$$

4) теплота реакції в процесі вирощування посівного матеріалу:

в поживному середовищі МРС-1 міститься близько 5% цукру у вигляді глюкози:

$$m_{цук} = 0,05 \cdot M_{nc} = 0,05 \cdot 50,88 = 2,54 \text{ кг}$$

$$E_p = \frac{m_{цук} \cdot r_{цук}}{\tau_{пр}};$$

де теплота згорання цукрів $r_{цук} = 2816 \text{ кДж/моль}$

Таким чином:

$$E_p = \frac{2,54 \cdot 2816 \cdot 10^3}{86400} = 0,000082 \text{ МДж}.$$

Сумарна кількість надходження теплоти в інокулятор:

$$\sum E_{надх} = E_{nc} + E_{nm} + E_{дис_1} + E_p;$$

$$\sum E_{надх} = 3,85 + 0,96 + 0,35 + 0,000082 = 5,16 \text{ МДж}.$$

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						112
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Витрати теплової енергії здійснюються [60]:

1) з культуральною рідиною:

$$E_k = M_k \cdot C_k \cdot t_k = \rho_k \cdot V_p \cdot C_k \cdot t_k;$$

де $t_k = 37^\circ\text{C}$ – температура культуральної рідини,

$C_k = 4070 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}$ – питома теплоємність культуральної рідини,

$\rho_k = 1060 \text{ кг/м}^3$ – густина культуральної рідини,

$$E_k = 1060 \cdot 0,06 \cdot 4070 \cdot 37 = 9,58 \text{ МДж.}$$

2) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot E_k;$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot 9,58 = 0,19 \text{ МДж.}$$

Сумарні витрати становлять:

$$\sum E_{\text{витрат}} = E_k + E_{\text{втр}};$$

$$\sum E_{\text{витрат}} = 9,58 + 0,19 = 9,77 \text{ МДж.}$$

Таким чином теплове навантаження у ферментері становить:

$$E_m = \sum E_{\text{витрат}} - \sum E_{\text{надх}};$$

$$E_m = 9,77 - 5,16 = 4,61 \text{ МДж.}$$

Тобто у систему необхідно підводити тепло [60].

$$Q = |E_T| = 4,61 \text{ МДж.}$$

$$Q = M_T \cdot C_T \cdot (t_{\text{ТП}} - t_{\text{ТК}}).$$

Звідки:

$$M_m = \frac{Q}{C_m \cdot \Delta t_m};$$

де $C_m = 4182 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}$ – питома теплоємність теплоносія,

$\Delta t_m = 2^\circ\text{C}$ – різниця між початковою та кінцевою температурами теплоносія, ($t_{\text{мн}} = 40^\circ\text{C}$; $t_{\text{мк}} = 38^\circ\text{C}$)

$$M_m = \frac{4,61 \cdot 10^6}{4182 \cdot 2} = 551,17 \text{ кг.}$$

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						113
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Масові витрати теплоносія:

$$G_m = \frac{M_m}{\tau_{np}};$$

$$G_m = \frac{551,17}{86400} = 0,0064 \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

Приймаємо до конструкції наступні параметри:

$$\delta_{\text{ст}} = 0,01 \text{ м} - \text{товщина стінки},$$

$$D_c = 0,55 \text{ м} - \text{діаметр сорочки інокулятора}.$$

Певні розміри відносно діаметрів ферментера [60]: $a = 0,03 \text{ м}; b = 0,25 \text{ м}$.

Еквівалентний діаметр:

$$d_{\text{екв}} = \frac{4ab}{2(a+b)};$$

$$d_{\text{екв}} = \frac{4 \cdot 0,03 \cdot 0,25}{2(0,25 + 0,03)} = 0,0536 \text{ м}.$$

Середній діаметр ферментера:

$$D_{\text{ср}} = D_c - a;$$

$$D_{\text{ср}} = 0,55 - 0,03 = 0,52 \text{ м}.$$

Для визначення поверхні теплообміну знаходимо коефіцієнти тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від поживного середовища у посівному апараті і коефіцієнт теплопередачі.

Проводимо розрахунок коефіцієнту тепловіддачі від середовища до стінки. Для цього визначаємо критерій Нуссельта з критеріального рівняння [69]:

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \cdot Fr_c^{0,1} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_m^2}{\mu_c};$$

$$Re_c = \frac{1060 \cdot 3,33 \cdot 0,16^2}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 58,3 \cdot 10^3.$$

Критерій Прандтля:

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						114
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c};$$

$$Pr_c = \frac{1,55 \cdot 10^{-3} \cdot 3788}{0,521} = 11,27.$$

Критерій Фруда:

$$Fr_c = \frac{n^2 \cdot d_m}{g};$$

$$Fr_c = \frac{(3,33^2 \cdot 0,16)}{9,81} = 0,18.$$

$$Nu_c = 1,35 \cdot (58,3 \cdot 10^3)^{0,59} \cdot 11,27^{0,38} \cdot 1 \cdot 0,18^{0,1} = 1850,45$$

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у ферментері становить:

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \lambda_c}{D};$$

$$\alpha_c = \frac{1850,45 \cdot 0,521}{0,5} = 1928,17 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}.$$

Теплофізичні властивості теплоносія [70]:

$$\rho_m = 992,4 \frac{кг}{м^3};$$

$$C_m = 4182 \frac{кДж}{кг \cdot К};$$

$$\lambda_m = 0,6514 \frac{Вт}{м \cdot К};$$

$$\vartheta_m = 0,661 \cdot 10^{-6} м^2/с.$$

$$\mu_m = 0,656 \cdot 10^{-3} Па \cdot с.$$

Коефіцієнт тепловіддачі теплоносія в сорочці визначають за наступною формулою [69]:

$$\alpha_m = \alpha_{m1} (1 + 3,54 \frac{d_{екс}}{D_{ср}}).$$

α_{m1} визначаємо з формули:

$$\alpha_{m1} = \left(\frac{Nu_m \cdot \lambda_m}{d_{екс}} \right) = \frac{0,68 \cdot 0,6514}{0,0536} = 8,3 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}.$$

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						115
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Критерій Нуссельта розраховуємо за формулою:

$$Nu_T = 0,008 \cdot (Re_m^{0,9} \cdot Pr_m^{0,43}) = 0,008 \cdot 70,28^{0,9} \cdot 4,21^{0,43} = 0,68.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{W_T \cdot d_{\text{екв}}}{\vartheta_T}$$

Відповідно для знаходження критерію Рейнольдса розрахуємо швидкість теплоносія:

$$W_m = \frac{V_m}{a \cdot b} = \frac{6,5 \cdot 10^{-6}}{0,03 \cdot 0,25} = 0,00087 \frac{\text{м}}{\text{с}}.$$

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_m = \frac{G_m}{\rho_m} = \frac{0,0064}{992,4} = 6,5 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}^3}{\text{с}}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{W_T \cdot d_{\text{екв}}}{\vartheta_T} = \frac{0,00087 \cdot 0,0536}{0,661 \cdot 10^{-6}} = 70,28;$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_T = \frac{\mu_T \cdot c_T}{\lambda_T};$$

$$Pr_T = \frac{0,656 \cdot 10^{-3} \cdot 4182}{0,6514} = 4,21$$

Коефіцієнт тепловіддачі становить:

$$\alpha_T = 8,3 \cdot (1 + 3,54 \frac{0,0536}{0,52}) = 11,33 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Коефіцієнт теплопередачі становить [70]:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}}$$

де $\lambda_{\text{ст}} = 17 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$ – теплопровідність стінки,

$$K = \frac{1}{\frac{1}{1928,17} + \frac{0,01}{17} + \frac{1}{11,33}} = 11,25 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						116
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розрахункова поверхня теплообміну [60]:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{cp} \cdot \tau_{пр}}$$

$$\Delta t_{\delta} = 40 - 37 = 3^{\circ}C;$$

$$\Delta t_m = 38 - 37 = 1^{\circ}C.$$

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_{\delta} - \Delta t_m}{\ln \frac{\Delta t_{\delta}}{\Delta t_m}} = 1,821^{\circ}C$$

$$F_p = \frac{4,61 \cdot 10^6}{11,25 \cdot 1,821 \cdot 86400} = 2,6 \text{ м}^2.$$

Розрахована площа теплообміну має бути меншою за дійсну площу, яку забезпечує даний теплообмінник.

$$F_p < F_d$$

За ГОСТ 9931-85 допустима площа за заданого об'єму та діаметру є рівною $3,71 \text{ м}^2$.

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$2,6 < 3,71 \text{ м}^2.$$

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Для автоматичної подачі поживного середовища та підтримання постійного потоку рідини у посівному апараті використовують насоси. Для забезпечення необхідної швидкості потоку можна застосовувати відцентрові, горизонтальні, консольні насоси ЦНБК 100/40 з робочим колесом закритого типу. Максимальна продуктивність таких насосів складає $100 \text{ м}^3/\text{год}$, що дозволяє регулювати швидкість потоків рідини на виробництві в широких межах. В даний час широким попитом користуються одноступінчасті консольні насоси АК, які придатні для перекачування поживного середовища МРС-1 в інокулятор. Загальні технічні характеристики обраного насосу АЦКМ 50-32-125/142/2: подача (витрата) – до $6 \text{ м}^3 / \text{год}$; напір - до 5,2 м; температура перекачуваної рідини - від -10 до $+140^{\circ}C$; температура

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						117
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

навколишнього середовища - до 40°C. Конструктивні дані - одноступінчастий насос з горизонтальним розташуванням валу, осьовим всмоктуючим і радіальним напірними патрубками; ущільнення вала торцеве, з'єднання вала електродвигуна і насоса через еластичну муфту; насос і електродвигун змонтовані на загальній сталевій рамі. Відцентрові насоси цієї серії виготовлені з нержавіючої сталі AISI 304.

Щоб ізолювати посівний матеріал від можливої мікробної контамінації з боку навколишнього середовища, його перекачування в інокулятор проводять за допомогою перистальтичного насосу. Такі насоси прості у використанні і обслуговуванні, тому що в них відсутні клапани, поршні, статори або обертаючі елементи. Обираємо до установки насос РТ-05 з продуктивністю 3,4 л/год [52].

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Апарати з перемішувачами пристроями для забезпечення безпечної експлуатації повинні відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003-91, ГОСТ 12.2.007.9-93 і конструкторських документів на апарат даного типу. Для забезпечення виконання вищезгаданих вимог в проектованому апараті реалізований захист від підвищеного тиску робочого середовища шляхом встановлення запобіжного клапану. Герметичність апарату по відношенню до зовнішнього середовища забезпечується встановленням сальникового ущільнення та проведенням надійного електрозварювання та монтажу апарату, відповідно до ГОСТ 24444-87. Від небезпечних значень електричного струму апарат має бути обладнаний захисним заземленням, згідно до ГОСТ 12.1.038-82 [71, 72].

Заземлюючі пристрої, призначені для захисту апаратів від статичної електрики, слід об'єднувати із заземлюючими пристроями для електроустаткування. Температура зовнішніх поверхонь апаратів або кожухів теплоізоляційних покриттів, доступних дотику з робочого місця обслуговуючого персоналу, не повинна перевищувати 45°C при установці

					<i>ПБ.БТ6206.ДП</i>	Арк.
						118
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

апаратів усередині виробничих приміщень. Рівень звуку і еквівалентний рівень звуку на робочих місцях поблизу апарата, виміряний за шкалою шумоміра, відповідно до вимог не повинен перевищувати 80 дБ [71, 73].

Для захисту повітря робочої зони передбачаються витяжні шафи і зонди надпосівним апаратом. Відходи в процесі вирощування посівного матеріалу незначні і представлені залишками культуральної рідини після культивування і відпрацьованою водою, що подавалася в сорочку апарату, та промивними водами. Всі рідкі відходи з метою збереження навколишнього середовища перед скиданням в каналізацію підлягають стерилізації і нейтралізації. Надалі їх спрямовують на очисні споруди. Спочатку проводять механічне очищення: проціджування крізь сітки, фільтрування, відстоювання, обробку в гідроциклонах, флотацію. Після здійснення таких процедур ступінь очищення рідких відходів становить близько 50%. Кінцевою стадією очищення стічних вод може бути хімічна обробка вапном, хлорування, озонування. Замість хімічної очистки можна також використовувати фізико-хімічне очищення, що полягає у використанні адсорбентів (активованого вугілля, цеолітів тощо). Ступінь очищення стічних вод при цьому становить близько 85% [60].

					<i>ПБ.БТ6206.ДП</i>	Арк.
						119
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ВИСНОВКИ

1. В проєкті для виробництва лікувально-профілактичного пробіотичного препарату Лактобактерину в якості промислового продуценту обрано штам *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, що характеризується високою антагоністичною активністю по відношенню до широкого спектру патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і володіє значною стійкістю до багатьох антибіотиків.

2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів пробіотиків та запропоновано схему отримання високопродуктивного продуценту шляхом індукованого мутагенезу з використанням в якості мутагенного фактору низькочастотного електромагнітного випромінювання впродовж трьох годин.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 визначено оптимальні умови культивування: температура $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$; pH 6,8—7, тривалість 8-10 годин за періодичного перемішування (200 об/хв) та подачі у казеїново-дріжджове поживне середовище вуглецевої добавки – стерильного розчину глюкози.

4. Для стадії вирощування посівної культури обрано та спроектовано посівний апарат об'ємом $0,1\text{ м}^3$, що за один виробничий цикл дозволяє отримати необхідну для культивування у ферментері кількість посівного матеріалу ($0,045\text{ м}^3$).

5. Для отримання стабільного цільового продукту на етапі сублімаційного сушіння запропоновано повільний режим заморожування біомаси протягом 48 годин, що необхідно для збереження цілісності бактеріальної клітини.

6. У відповідності до аналітичної нормативної документації та методів

					ПБ.БТ6206.ДП			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Державцева Ю.І.			ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	120	131
Керівник		Олійник Н.М.						
Затвер.							КПІ ім. Ігоря Сікорського	

контролю якості готового продукту розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва пробіотичного препарату Лактобактерин у формі ліофільно висушеної мікробної маси штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 у скляних флаконах об'ємом 10 мл.

					ПБ.БТ6206.ДП	Арк.
						121
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		